



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**“Estudio de los efectos de la ghrelina sobre los circuitos neuronales del tallo encefálico”**

---

**Tesista: Lic. María Paula Cornejo**

**Director: Dr. Mario Perelló**

**Año: 2019**

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>Sistema de ghrelina y GHSR .....</b>	<b>7</b>
<b>Efectos de la ghrelina y el GHSR en sus núcleos cerebrales blanco .....</b>	<b>9</b>
La ghrelina y el GHSR en el hipotálamo.....	9
La ghrelina y el GHSR en el complejo dorsal del vago.....	11
La ghrelina y el GHSR en el circuito mesolímbico.....	13
<b>Metodologías para estudiar el sistema de ghrelina y GHSR en el cerebro.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>20</b>
1. Animales experimentales.....	20
2. Dietas utilizadas .....	21
3. Reactivos.....	21
4. Genotipado de animales .....	24
5. Cirugías estereotáxicas .....	25
6. Procedimientos experimentales .....	25
6.1 Estudio de los circuitos neuronales del complejo dorsal del vago que son regulados por el sistema de ghrelina y GHSR.....	25
6.2 Estudio de las poblaciones neuronales del circuito mesolímbico que son regulados por el sistema de ghrelina y GHSR.....	31
7. Perfusión y procesamiento de muestras de cerebro .....	36
8. Inmuno-tinciones.....	36
9. Análisis neuroanatómico cuantitativo .....	39
10. Obtención de imágenes .....	40
11. Análisis estadístico .....	41
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>Estudio de los circuitos neuronales del complejo dorsal del vago que son regulados por el sistema de ghrelina y GHSR .....</b>	<b>43</b>

1. Estudio de la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el complejo dorsal del vago.....	43
2. Caracterización del fenotipo neuronal presente en los núcleos cerebrales del complejo dorsal del vago que expresan el GHSR.....	48
3. Estudio de la respuesta de las neuronas del complejo dorsal del vago a aumentos en la concentración plasmática de ghrelina .....	50
4. Estudio de las funciones moduladas por el sistema de ghrelina y GHSR a través del complejo dorsal del vago .....	54
Estudio de las poblaciones neuronales del circuito mesolímbico que son reguladas por el sistema de ghrelina y GHSR .....	59
1. Estudio de la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el circuito mesolímbico.....	59
2. Caracterización del fenotipo neuronal presente en los núcleos del circuito mesolímbico que expresan el GHSR .....	61
4. Estudio del efecto de la administración sistémica de ghrelina sobre los núcleos del circuito mesolímbico ...	65
5. Estudio de las implicancias de la presencia del GHSR exclusivamente las neuronas dopaminérgicas .....	66
6. Estudio el rol del sistema de ghrelina y GHSR sobre la ingesta de alimento regulada por el circuito mesolímbico .....	70
DISCUSIÓN .....	75
Rol modulador de la ghrelina y el GHSR sobre las neuronas del complejo dorsal del vago .....	80
Rol modulador de la ghrelina y el GHSR sobre las neuronas del circuito mesolímbico.....	86
Implicancias de la presencia del GHSR exclusivamente las neuronas dopaminérgicas .....	89
Estudio el rol del sistema de ghrelina y GHSR sobre la ingesta de alimento regulada por el circuito mesolímbico .....	92
CONCLUSIONES .....	96
BIBLIOGRAFÍA .....	97
TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS .....	111

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de Tesis no hubiera sido posible sin la mentoría del Dr. Mario Perelló. Cada experimento, resultado, discusión y conclusión de todo el trabajo de estos cinco años, y un poco más, son gracias a su apoyo, compañía, confianza y dedicación a la ciencia. Muchas gracias Mario.

Además, la gente del laboratorio de Neurofisiología del IMBICE con la que comparto el día a día ha aportado en una gran proporción para que todo lo que está escrito más adelante, esté escrito más adelante. En especial al Dr. Nicolás De Francesco, a la Dra. Agustina Cabral y al Lic. Franco Barrile, que tienen grandes méritos en que toda esta Tesis haya salido adelante. Agradezco también a los integrantes del laboratorio de Electrofisiología, al sector de Bioterio, Microscopía y Cultivos Celulares del IMBICE. Todos ellos han colaborado de distintas formas para la realización de esta Tesis.

Debo agradecer al CONICET, a la CIC-PBA, a la UNLP y a la ANPCyT, por brindar los medios económicos que permitieron desarrollar todo el trabajo de mi Tesis Doctoral.

Finalmente, nunca voy a agradecerle lo suficiente a mi familia. A mis viejos y a mis hermanas que, a pesar de entender bastante poco de ghrelina y del sistema científico, nunca dejaron de estar orgullosos de mí y de alentarme en cada instancia. Y obviamente a Nacho, que convive día a día y comparte conmigo todos mis sentimientos (cambiantes) hacia la ciencia, mis logros, mis no logros y mis humores. Gracias infinitas.

## ABREVIATURAS

ADN .....	Ácido desoxirribonucleico
AgRP .....	Péptido relacionado a Agouti
AP .....	Área postrema
ARNm .....	Ácido ribonucleico mensajero
ARC .....	Núcleo arcuato
AVT .....	Área ventral tegmental
CART .....	Transcripto regulado por cocaína y anfetamina
CCK .....	Colecistoquinina
ChAT .....	Colina acetil-transferasa
CLi .....	Núcleo caudal linear
CRH .....	Hormona liberadora de corticotropina
DACG .....	Dieta de alto contenido graso
DAT .....	Transportador activo de dopamina
DBSCAN .....	Agrupamiento espacial de aplicaciones con ruido basado en densidad
eGFP .....	Proteína fluorescente verde
ERK .....	Quinasa regulada por señales extracelulares
GABA .....	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GHSR .....	Receptor de secretagogos de hormona de crecimiento
GLP-1 .....	Péptido similar al glucagón-1
GOAT .....	Ghrelin-O-acetil transferasa
ICV .....	Intra-cerebro-ventricular
IF .....	Núcleo interfascicular
IP .....	Intraperitoneal

# ABREVIATURAS

ISHH .....	Histoquímica de hibridación <i>in situ</i>
LCR .....	Líquido cefalorraquídeo
LCRa .....	Líquido cefalorraquídeo artificial
MAPK .....	Proteína quinasa activada por mitógeno
NAcb .....	Núcleo accumbens
NAcbC .....	Núcleo accumbens centro
NAcbShL .....	Núcleo accumbens caparazón lateral
NAcbShM .....	Núcleo accumbens caparazón medial
NPV .....	Núcleo paraventricular
NPY .....	Neuropéptido Y
NTS .....	Núcleo del tracto solitario
PBP .....	Área parabraquial pigmentada
PBS .....	Buffer fosfato-salina
PCR .....	Reacción en cadena de la polimerasa
PN .....	Núcleo paranigral
POMC .....	Pro-opiomelanocortina
RLi .....	Núcleo rostral-linear
SC .....	Subcutáneo
SN .....	Sustancia nigra
SNpc .....	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
TBC .....	Casete de bloqueo de la transcripción
TH .....	Tirosina hidroxilasa
TRH .....	Hormona liberadora de tirotropina
WT .....	<i>Wild-type</i>

## INTRODUCCIÓN

La ghrelina es una hormona peptídica secretada por células especializadas del estómago y que actúa principalmente en el cerebro (Müller et al., 2015). La ghrelina regula una amplia variedad de procesos, entre los que se pueden mencionar la secreción de hormona de crecimiento, la homeostasis de glucosa, la actividad de ejes neuroendócrinos, el peso corporal y la motilidad gastrointestinal, entre otros. La característica que destaca a la ghrelina es que es la única hormona conocida por estimular el apetito, haciéndolo a través de la regulación de distintos circuitos neuronales que modulan diferentes aspectos del consumo de alimentos. La función moduladora más estudiada de la ghrelina es la capacidad de regular la ingesta de alimento de acuerdo a las necesidades energéticas del organismo (Müller et al., 2015; Yanagi et al., 2018). Sin embargo, la ghrelina también es capaz de regular, actuando a nivel central, el vaciado y la motilidad gastrointestinal y el consumo de ciertos tipos de alimentos de acuerdo al valor de recompensa que genera la ingesta de los mismos (Perello and Dickson, 2015; Swartz et al., 2014). Estos efectos de la ghrelina se dan por acción de la hormona sobre núcleos cerebrales situados en el tallo encefálico. Sin embargo, no se conoce con claridad la base neuroanatómica y funcional que subyace a los efectos de la ghrelina sobre estos núcleos cerebrales. Esclarecer los mecanismos a través de la cuales la ghrelina actúa resulta de gran interés debido a las implicancias que poseen en el mantenimiento de la homeostasis energética.

Así, el objetivo general de este trabajo de Tesis fue estudiar el rol modulador de la ghrelina sobre los circuitos neuronales del tallo encefálico y determinar si la presencia del receptor de ghrelina en ellos modula procesos relacionados a la ingesta de alimentos.

### **Sistema de ghrelina y GHSR**

La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos secretada por células localizadas en el fundus del estómago. En humanos, la ghrelina es secretada por células denominadas P/D1 (Rindi et al., 2002), mientras que en roedores las células secretoras de ghrelina se denominan tipo X/A (Date et al., 2000). Los mayores niveles de secreción de ghrelina se dan en estómago, aunque también se detecta liberación de la hormona desde duodeno, yeyuno, páncreas y riñón (Dornonville de la Cour et al., 2001). La ghrelina es sintetizada como preproghrelina, un péptido de 117 aminoácidos que es posteriormente clivado para generar proghrelina, de 94 aminoácidos. Luego, la proghrelina es modificada por la enzima GOAT (de sus siglas en inglés para *Ghrelin O-Acyl/Transferase*) que le adiciona un grupo *n*-octanoilo en el residuo de serina 3, modificación que resulta de fundamental importancia para la bioactividad de la ghrelina (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008). Posteriormente, la proghrelina octanoilada es clivada por la enzima prohormona convertasa 1/3 para generar ghrelina, a partir del extremo N-terminal, y obestatina, a partir del extremo C-terminal. Este procesamiento postraducciona ocurre en las células del fundus del estómago y una vez madura y octanoilada, la ghrelina es secretada a circulación, a través de la cual llega a su principal órgano blanco, el cerebro. La ghrelina octanoilada es la única forma capaz de unirse a su receptor y la que muestra los efectos descritos para la hormona. Cabe

mencionar que también existe en circulación, representando aproximadamente el 90% del total de ghrelina, la forma des-octanoilada de la hormona (Patterson et al., 2005). Se ha mostrado que la ghrelina des-octanoilada tiene efectos independientes del receptor de ghrelina, bloqueando el efecto orexigénico de la ghrelina y con efectos sobre la glucemia de roedores (Fernandez et al., 2016; Zhang et al., 2008). Sin embargo, aún se desconocen una función y un receptor específicos para la ghrelina des-octanoilada y se ha llegado a proponer que la misma es un artefacto del método de detección de la ghrelina en plasma.

La síntesis y secreción de la ghrelina se encuentran reguladas por varios mecanismos, aunque la mayor variación en los niveles plasmáticos de la hormona se da de acuerdo al estatus energético de los organismos. Los niveles plasmáticos de ghrelina aumentan aproximadamente al doble en antelación a las comidas, y vuelven a descender alrededor de una hora después del consumo de alimentos (Cummings, 2006). A su vez, los niveles de ARNm de ghrelina en estómago aumentan en situaciones de ayuno, mientras que la realimentación devuelve a los valores basales de ARNm y proteína (Toshinai et al., 2001). La disminución en la secreción de ghrelina después del consumo de alimentos es proporcional a la cantidad de calorías consumidas y depende de la composición de los alimentos ingeridos, siendo los carbohidratos los nutrientes más efectivos para disminuir los niveles de ghrelina circulante (Monteleone et al., 2003). También se sabe que los picos en los niveles plasmáticos de ghrelina predicen la ingesta de alimentos cuando el patrón de consumo se mantiene en el tiempo (Drazen et al., 2006; Frecka and Mattes, 2008). Por otro lado, la secreción de ghrelina es estimulada por una activación del sistema nervioso simpático y por agonistas adrenérgicos (Goldstein et al., 2011). Además, el proceso de octanoilación de la hormona es otro punto de control en su síntesis ya que, por ejemplo, los niveles de ARNm y de proteína de GOAT aumentan en condiciones de ayuno (González et al., 2008; Stengel et al., 2010). Todos estos puntos de control en la síntesis y secreción de ghrelina permiten el ajuste fino de los niveles de la hormona de acuerdo a la situación energética de los organismos.

El receptor de ghrelina, conocido como GHSR (de sus siglas en inglés para *growth hormone secretagogue receptor*) es un receptor acoplado a proteína G que se expresa principalmente en el sistema nervioso central (Guan et al., 1997; Zigman et al., 2006). Existen dos variantes del receptor generadas por empalme alternativo del ARNm, denominadas GHSR 1a y 1b. En la actualidad, se sabe que la forma 1a del receptor es la única forma a la que se une y a través de la cual actúa la ghrelina. El GHSR posee siete dominios transmembrana y puede acoplarse a las proteínas  $G_q$  y  $G_{i/o}$ , desencadenando distintas cascadas intracelulares de señalización en cada caso (Camiña et al., 2007). Además, la unión de la ghrelina al GHSR permite que el receptor interactúe y forme un complejo multiproteico con las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 y otras proteínas de la cascada de MAPK, lo que termina produciendo la fosforilación y activación de ERK 1/2, con la consecuente activación de los factores de transcripción corriente abajo de ERK (Camiña et al., 2007). Una característica importante del receptor de ghrelina es que presenta una elevada actividad constitutiva en ausencia de su ligando endógeno, llegando a señalizar con casi un 50% de su capacidad en ausencia de la ghrelina (Damian et al., 2012). Se ha postulado que la actividad constitutiva del GHSR tiene especial importancia en núcleos cerebrales en los que la ghrelina tiene una accesibilidad limitada. Por otro lado, es importante mencionar que el GHSR también es capaz de



formar dímeros con otros receptores acoplados a proteínas G como el receptor de serotonina 5c, el receptor de melanocortinas 3 y los receptores de dopamina D1 y D2 (Wellman and Abizaid, 2015). Así, la actividad del GHSR independiente de la ghrelina también ejerce un rol modulador de las vías de señalización de otros receptores y se postula que ésta podría ser la función del receptor en los núcleos cerebrales en los que la ghrelina tiene accesibilidad limitada.

## **Efectos de la ghrelina y el GHSR en sus núcleos cerebrales blanco**

### ***La ghrelina y el GHSR en el hipotálamo***

El efecto que destaca a la ghrelina al unirse al GHSR en el cerebro es el de estimular la ingesta de alimento. Este efecto se encuentra mayoritariamente ligado a la acción de la ghrelina sobre el hipotálamo, en donde se hallan los mayores niveles de GHSR (Chuang et al., 2011; Zigman et al., 2006). En el hipotálamo se encuentra el núcleo arcuato (ARC), que es considerado uno de los principales orquestadores de la regulación del balance energético (Willesen et al., 1999). Además, en el hipotálamo se encuentran otros núcleos cerebrales ligados al control del balance energético como el núcleo paraventricular (NPV), el núcleo dorsomedial, el núcleo ventromedial y el hipotálamo lateral. El ARC posee la ventaja de encontrarse en contacto con la eminencia media, que es un órgano circunventricular. La importancia de que el ARC se encuentre en contacto con un órgano circunventricular yace en que la ghrelina no atraviesa la barrera hemato-encefálica presente en la mayoría de los vasos que irrigan el cerebro (Banks et al., 2002). Los órganos circunventriculares, en cambio, son estructuras especializadas que poseen capilares fenestrados, los cuales están formados por células endoteliales con poros a través de los cuales pueden difundir pequeñas moléculas y proteínas (Kaur and Ling, 2017). Así, el ARC sería capaz de recibir a la ghrelina proveniente de circulación gracias al ingreso de la hormona a través de los capilares fenestrados presentes en la eminencia media.

El ARC está compuesto por dos poblaciones neuronales involucradas en el control del apetito, neuronas que co-producen y co-liberan péptido relacionado a Agouti (AgRP) y neuropéptido Y (NPY), con efectos orexigénicos, y otro conjunto de neuronas que co-produce y co-libera hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), derivado de la proopiomelanocortina (POMC), y transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART), con efectos anorexigénicos (Tabla 1, (Morton et al., 2006)). El balance entre la actividad de estas dos poblaciones neuronales determina la regulación del apetito por parte del ARC. Las neuronas que producen AgRP/NPY también secretan el neurotransmisor inhibitorio ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y se ha demostrado que las mismas inervan a las neuronas POMC/CART de modo que, cuando las neuronas AgRP/NPY secretan los péptidos orexigénicos también liberan GABA que inhibe a las neuronas anorexigénicas POMC/CART (Morton et al., 2006). Al mismo tiempo, ambas poblaciones neuronales del ARC envían proyecciones a los demás núcleos hipotalámicos, principalmente el NPV, en donde yace un segundo punto de control del balance energético.

Además de las poblaciones de neuronas AgRP/NPY y POMC/CART, en el ARC reside una tercera población de neuronas que se caracteriza por producir y liberar dopamina. Esta población neuronal se divide, a su vez,

en tres sub-poblaciones distintas de acuerdo a su sitio de proyección: las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares, que proyectan hacia la parte externa de la eminencia media, las neuronas dopaminérgicas tuberohipofiseales, cuyas proyecciones terminan en los lóbulos intermedio y posterior de la hipófisis, y las neuronas dopaminérgicas periventriculares hipofiseales, que proyectan hacia el lóbulo intermedio de la hipófisis (Grattan, 2015). De estas tres poblaciones dopaminérgicas, la más estudiada ha sido la de neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares, situadas en la parte dorsomedial del ARC y con un rol inhibitorio sobre la liberación de prolactina desde la hipófisis. La dopamina liberada en la eminencia media por las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares es transportada por el sistema porta-hipofisario hacia la hipófisis anterior, en donde inhibe la síntesis y liberación de prolactina por parte de los lactotropos (células especializadas de la hipófisis que sintetizan y liberan prolactina) (Grattan, 2015).

Las neuronas del ARC son las primeras en responder a señales circulantes de hambre o saciedad. La ghrelina actúa preferencialmente sobre las neuronas AgRP/NPY del ARC, ya que la mayoría expresa el GHSR (Willemsen et al., 1999). Al unirse a su receptor, la ghrelina desencadena cascadas intracelulares que finalmente provocan que las neuronas AgRP/NPY se activen y liberen dichos péptidos sobre sus neuronas blanco en el NPV. El NPY activa las neuronas del NPV, mientras que el AgRP antagoniza el efecto de los péptidos anorexigénicos liberados por las neuronas POMC/CART que también inervan a las neuronas del NPV (Yanagi et al., 2018). Al mismo tiempo, la unión de la ghrelina al GHSR provoca que las neuronas AgRP/NPY liberen GABA sobre las neuronas POMC/CART del propio ARC, disminuyendo la probabilidad de liberación de los neurotransmisores anorexigénicos sobre las neuronas del NPV. Todos estos efectos a nivel molecular terminan desencadenando un aumento en la ingesta. Además de actuar sobre las neuronas AgRP/NPY, algunas evidencias indican que la ghrelina también tiene efecto sobre las neuronas dopaminérgicas del ARC, ya que una fracción de las mismas expresa el GHSR y la ghrelina despolariza el potencial de membrana de dichas neuronas (Zhang and van den Pol, 2016; Zigman et al., 2006). Al mismo tiempo, un ayuno de 24 horas aumenta el porcentaje de neuronas dopaminérgicas del ARC que expresan el marcador de activación neuronal c-Fos y el tratamiento de cultivos de neuronas dopaminérgicas del ARC con ghrelina aumenta el número y el largo de sus dendritas, sugiriendo que la ghrelina activa una fracción de las neuronas dopaminérgicas del ARC (Huang et al., 2015; Zhang and van den Pol, 2016). Sin embargo, la administración de ghrelina a ratones no cambia la fracción de neuronas dopaminérgicas del ARC que expresan c-Fos y el tratamiento de mujeres con ghrelina produce un aumento en los niveles plasmáticos de prolactina (Messini et al., 2017; Pirnik et al., 2014). Así, queda por esclarecer la base molecular y el efecto de la ghrelina sobre las neuronas dopaminérgicas del ARC.

Núcleo cerebral	Poblaciones neuronales presentes	Procesos regulados
<b>Núcleo arcuato</b> (hipotálamo)	NPY/AgRP (GABA) POMC/CART Dopamina	Homeostasis energética Ejes neuroendócrinos (hormona de crecimiento, prolactina, gonadotrofinas)
<b>Complejo dorsal del vago</b>	GABA Catecolaminas Enkefalinas NPY TRH CRH Glutamato CCK Serotonina Neurotensina	Presión arterial Balance hidrosalino Ingesta Reflejo emético Motilidad gastrointestinal Frecuencia respiratoria
<b>Área ventral tegmental</b> (circuito mesolímbico)	Dopamina GABA Glutamato	Recompensa Motivación Aprendizaje por refuerzo Salencia del incentivo Comportamientos dirigidos a la obtención de recompensas

**Tabla 1. Principales poblaciones neuronales y funciones reguladas por los distintos núcleos cerebrales blanco del sistema de ghrelina y GHSR.** El cuadro muestra las distintas poblaciones neuronales (columna del medio) presentes en los distintos núcleos blanco del sistema de ghrelina y GHSR (columna izquierda). En la columna derecha se indican algunas de las funciones reguladas por cada uno de los núcleos mencionados en la columna izquierda.

## ***La ghrelina y el GHSR en el complejo dorsal del vago***

Además del ARC, existen otros núcleos cerebrales que expresan el GHSR, entre los que se destacan los núcleos cerebrales que forman parte del complejo dorsal del vago (Zigman et al., 2006). El complejo dorsal del vago está compuesto por el núcleo del tracto solitario (NTS), el área postrema (AP) y el complejo motor dorsal del vago, y está localizado en el bulbo raquídeo del tallo encefálico. El complejo dorsal del vago se ha conservado evolutivamente ya que regula funciones básicas que determinan la supervivencia de los organismos (Tabla 1), lo cual se refleja en su existencia y función tanto en el sistema nervioso de reptiles como en el de mamíferos (Porges, 2001). Los tres núcleos cerebrales que componen el complejo dorsal del vago están principalmente relacionados con el control de funciones asociadas al sistema nervioso autónomo como la presión arterial, el balance hídrico, la frecuencia respiratoria y la motilidad gastrointestinal, entre otras (Barraco, 1993). El NTS es un núcleo extenso y las neuronas que lo forman pueden agruparse de acuerdo al tipo de aferencias que reciben. A modo general, las neuronas localizadas en la parte rostral del NTS reciben inervaciones de nervios gustatorios como el *chorda tympani*, petroso superficial mayor, glosofaríngeo y superior laríngeo, mientras que las neuronas de la parte caudal del NTS reciben, principalmente, aferencias del nervio vago que transmite información del sistema digestivo, entre otros (Barraco, 1993). El NTS está compuesto por varios tipos neuronales, entre los que se pueden mencionar neuronas GABA, neuronas catecolaminérgicas,

neuronas que producen hormona liberadora de corticotrofina (CRH, de sus siglas en inglés para *Corticotropin-Releasing Hormone*), neuronas que producen NPY, neuronas que producen hormona liberadora de tirotrófina (TRH, de sus siglas en inglés para *Tirotropin-Releasing Hormone*) y neuronas que producen encefalinas. Cada una de estas poblaciones neuronales se ha asociado preferencialmente a alguna de las funciones reguladas por el NTS, por ejemplo, las neuronas catecolaminérgicas se asocian principalmente a la regulación de la función cardíaca (Barraco, 1993). En el caso del AP, también se ha descrito la presencia de neuronas GABA y catecolaminérgicas, así como también neuronas glutamatérgicas y neuronas que producen colecistoquinina (CCK), encefalinas, neurotensina o serotonina (Tabla 1). Algunas de estas poblaciones neuronales del AP tienen roles definidos, como las neuronas catecolaminérgicas y las productoras de colecistoquinina mediando el reflejo emético, mientras que para otras poblaciones neuronales no se ha definido un rol específico (Price et al., 2008). Similar a lo que sucede con la eminencia media hipotalámica, el AP es un órgano circunventricular capaz de monitorear la concentración de distintos factores circulantes gracias a la presencia de capilares fenestrados. Además, las neuronas que forman parte del AP expresan receptores para una gran variedad de péptidos y hormonas como adiponectina, amilina, angiotensina II, ghrelina, orexinas y vasopresina, entre otros (Fry et al., 2007). Así, se cree que las neuronas del AP transmiten la información sobre la concentración de distintos factores circulantes a las neuronas del NTS, a través de las inervaciones existentes entre ambos núcleos (Price et al., 2008). Las neuronas del AP modulan la actividad de las neuronas del NTS que, a su vez, transmiten la información a las neuronas del complejo motor dorsal del vago. El complejo motor dorsal del vago está compuesto principalmente por neuronas preganglionares parasimpáticas que transmiten la información a neuronas posganglionares colinérgicas efectoras de la respuesta.

La ghrelina podría actuar de forma directa sobre las neuronas del AP y del NTS, ya que las mismas expresan el GHSR (Mani et al., 2014; Zigman et al., 2006). Además, la ghrelina podría afectar la actividad de las neuronas del NTS de forma indirecta ya que las neuronas aferentes vagales provenientes del ganglio nodoso, que inervan el NTS, expresan el GHSR y tienen acceso directo a la ghrelina en circulación (Grabauskas et al., 2015). Una de las funciones moduladas por la ghrelina a través del NTS es el consumo de alimento. Se ha mostrado que el efecto orexigénico de la hormona en ratas se ve disminuido por eliminación de las aferencias vagales por vagotomía (Date et al., 2002). En contraposición, otro estudio en ratas mostró que la deaferenciación vagal subdiafragmática no modifica la ingesta inducida por administración periférica de ghrelina (Arnold et al., 2006). Estudios de nuestro laboratorio muestran que roedores con el ARC ablacionado pero que mantienen el NTS intacto no incrementan la ingesta en respuesta a inyecciones periféricas de ghrelina, sugiriendo que la sola presencia del NTS no es suficiente para que la hormona ejerza su efecto orexigénico (Cabral et al., 2014). Sin embargo, la hormona administrada directamente en el cuarto ventrículo cerebral de roedores aumenta la ingesta y el número de células que expresa c-Fos en el NTS (Faulconbridge et al., 2003, 2008). Dicho aumento en la ingesta se atribuye a la acción de la hormona sobre el NTS, ya que el flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR) impediría que la hormona inyectada en el cuarto ventrículo cerebral actúe sobre el ARC. Además, la administración de ghrelina directamente en el tercer ventrículo cerebral (vía intra-cerebroventricular, ICV) de los ratones con el ARC ablacionado produce un aumento en la ingesta similar al que muestran los animales

con el ARC intacto (Cabral et al., 2014). Así, el efecto orexigénico de la ghrelina mediado por el NTS es debatido. Por otro lado, además de modular el consumo de alimento, la ghrelina podría regular otros procesos actuando sobre el NTS, como la presión arterial (Lin Yingzi et al., 2004) y la secreción de ácido gástrico (Date et al., 2001). Estos efectos de la ghrelina también han sido estudiados a nivel central, pero tampoco se descartan efectos directos de la hormona sobre los órganos periféricos que también expresan el GHSR.

En cuanto al efecto de la ghrelina sobre el AP, se ha mostrado que las administraciones intravenosas de ghrelina aumentan la secreción de proteínas pancreáticas, efecto que es mediado por el AP ya que ratas con el AP ablacionada no muestran secreción de proteínas pancreáticas en respuesta a ghrelina (Li et al., 2006). A su vez, se ha reportado que la ghrelina modifica la actividad eléctrica de algunas neuronas del AP (Fry and Ferguson, 2009; Li et al., 2006). Por otro lado, se ha mostrado también que la administración periférica y central de ghrelina inhibe el consumo de agua, proceso modulado por el AP (Hashimoto et al., 2007). Resultados de nuestro laboratorio muestran que el AP es, junto con el ARC y la eminencia media, una de las regiones del cerebro donde se observa la presencia de ghrelina fluorescente cuando la misma se administra por vía subcutánea (Cabral et al., 2014). Además, se ha demostrado que la ablación del AP impide que se detecten aumentos en el número de neuronas que expresa c-Fos en el NTS en respuesta a ghrelina (Li et al., 2006). Así, es pausable que el AP actúe como blanco principal de la ghrelina en el complejo dorsal del vago, ya que es la estructura capaz de censar cambios en los niveles circulantes de la hormona, y luego transmita la información al NTS a través de las inervaciones que existen entre ambos núcleos. Sin embargo, el mecanismo y las funciones que ambos núcleos median en relación a la ghrelina no están completamente definidos.

## ***La ghrelina y el GHSR en el circuito mesolímbico***

El circuito mesolímbico es otro mediador importante de los diversos efectos del sistema de ghrelina y GHSR. Se ha descrito en muchos estudios que la hormona es capaz de regular funciones mediadas por dicho circuito y, al mismo tiempo, se ha reportado la expresión del GHSR en el área ventral tegmental (AVT), que es uno de los principales núcleos cerebrales que conforman el circuito mesolímbico (Chuang et al., 2011; Zigman et al., 2006). Además del AVT, el otro núcleo clave que forma parte del circuito mesolímbico es el núcleo accumbens (NAcb). El circuito entre ambos núcleos se asocia, de forma general, al procesamiento de experiencias que causan recompensa y, de especial importancia para este trabajo de Tesis, al procesamiento de la recompensa que provoca la ingesta de ciertos tipos de alimentos (Berridge and Kringelbach, 2015; Perello and Dickson, 2015). El AVT es un núcleo complejo y heterogéneo situado en el mesencéfalo del tallo encefálico que está compuesto principalmente por neuronas que producen dopamina, las cuales representan aproximadamente el 60-65% del total de neuronas del AVT. El 35% restante de la población neuronal del AVT está conformado por neuronas GABA (aproximadamente un 30%) y por neuronas que producen glutamato (aproximadamente un 5% del total) (Tabla 1, (Ikemoto, 2007; Nair-Roberts et al., 2008)). Las neuronas dopaminérgicas del AVT envían sus axones y liberan dopamina principalmente en el estriado ventral, en donde se localiza el NAcb. Las neuronas GABA del AVT son mayoritariamente interneuronas inhibitorias cuyo rol principal es el de regular la actividad de las neuronas dopaminérgicas, aunque también se sabe que algunas neuronas GABA del AVT

proyectan hacia núcleos cerebrales inervados por el AVT (Margolis et al., 2012; Morales and Margolis, 2017). Las neuronas que conforman el AVT se distribuyen en distintos sub-núcleos: el núcleo interfascicular (IF), el núcleo paranigral (PN), el área parabraquial pigmentada (PBP), y los núcleos rostral (RLi) y caudal linear (CLi) (Phillipson, 1979; Sanchez-Catalan et al., 2014). Estos sub-núcleos se han estudiado de acuerdo a funciones y conexiones diferenciales con las distintas subdivisiones del NAcB (Lammel et al., 2014). Además, las neuronas del AVT también envían proyecciones a otros núcleos del estriado ventral, la corteza prefrontal, la amígdala basolateral, el hipocampo y la habénula lateral (Bariselli et al., 2016). Junto al AVT en el mesencéfalo reside la sustancia nigra (SN), otra de las poblaciones de neuronas dopaminérgicas más importantes del cerebro cuya función se asocia al control de movimientos voluntarios. La SN se puede subdividir en dos regiones, la SN *pars compacta* (SNpc), formada mayoritariamente por neuronas dopaminérgicas y, en menor medida, por neuronas GABA, y la SN *pars reticulata*, con mayoría de neuronas GABA (Nair-Roberts et al., 2008). El GHSR es expresado mayoritariamente por las neuronas que forman parte de la SNpc (Andrews et al., 2009; Zigman et al., 2006). Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc envían sus proyecciones a núcleos situados en el estriado dorsal y esta subdivisión de la SN se ha estudiado ampliamente, ya que la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. En cuanto a la acción de la ghrelina sobre la SN, se ha mostrado que la hormona tiene efectos neuroprotectores en modelos animales de Parkinson en los que se induce químicamente la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Andrews et al., 2009; Maswood et al., 2004). Estos efectos se darían gracias a la presencia del GHSR en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Stievenard et al., 2017), aunque no están del todo claros los mecanismos moleculares que median el efecto neuroprotector de la ghrelina.

El NAcB se encuentra localizado en la parte ventral del estriado, formando parte del cerebro anterior. Está compuesto mayoritariamente por neuronas GABA, conocidas como “*medium spiny neurons*”, las cuales proyectan hacia núcleos inervados por el NAcB y, en menor medida, por neuronas colinérgicas e interneuronas GABA (Meredith et al., 1993). El NAcB se divide en tres subregiones, denominadas centro (NAcBC), caparazón medial (NAcBShM) y caparazón lateral (NAcBShL). Cada subregión del NAcB presenta una conexión diferencial con los sub-núcleos del AVT, por ejemplo, el NAcBC y el NAcBShM están mayoritariamente inervados por el IF, el PN y la parte medial del PBP, mientras que el NAcBShL está inervado preferentemente por la parte lateral del PBP (Lammel et al., 2014). Las neuronas del NAcB reciben inervaciones dopaminérgicas provenientes del AVT y la dopamina liberada por esas inervaciones puede tener efectos excitatorios o inhibitorios, dependiendo del receptor al cual se una. Los receptores de dopamina son receptores acoplados a proteínas G y se agrupan en dos familias, los receptores tipo D1 y los receptores tipo D2. De forma general, los receptores de la familia D1, que comprende a los receptores D1 y D5, son de naturaleza excitatoria ya que se acoplan a la proteína  $G_{s/o}$  y estimulan la producción de AMP cíclico por activación de la adenilil ciclasa. Los receptores de la familia D2, entre los que se encuentran los receptores D2, D3 y D4, se acoplan a la proteína  $G_{i/o}$  y actúan de forma inhibitoria (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Los receptores tipo D1 son exclusivamente expresados por las neuronas del NAcB, mientras que los de la familia D2 son expresados tanto por las neuronas del NAcB como por las propias neuronas dopaminérgicas del AVT (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Así, los receptores D2

presentes en los terminales de las neuronas dopaminérgicas actúan como automoduladores de la liberación de dopamina.

En lo que refiere a la acción de la ghrelina sobre el circuito mesolímbico, el principal blanco de la hormona sería el AVT ya que en él se concentran las neuronas que expresan el GHSR, mientras que el NAcb no presenta niveles apreciables de expresión del GHSR (Abizaid et al., 2006; Chuang et al., 2011; Zigman et al., 2006). La mayoría de los trabajos que estudian el efecto de la ghrelina sobre el circuito mesolímbico muestran resultados de administraciones centrales de ghrelina y su efecto sobre la modulación de experiencias que causan recompensa. La administración directa de ghrelina en el AVT aumenta, de forma aguda, la ingesta de alimentos, el consumo de alcohol, el esfuerzo por obtener dietas de alto contenido graso y los comportamientos sexuales (Egecioglu et al., 2010; Jerlhag et al., 2006, 2008, 2009; Lockie et al., 2015; Prieto-Garcia et al., 2015; St-Onge et al., 2016). Por otro lado, los aumentos agudos en la concentración plasmática de ghrelina también podrían impactar en el AVT ya que la administración sistémica de ghrelina condiciona la preferencia por un lugar asociado a una dieta estándar o de alto contenido graso (Disse et al., 2011; Lockie et al., 2015; Perello et al., 2010). Todos estos efectos de la hormona se han asociado a su efecto sobre el AVT provocando la liberación de dopamina en el NAcb, ya que tanto la administración ICV como periférica de ghrelina aumenta los niveles de dopamina en el NAcb (Jerlhag, 2008; Jerlhag et al., 2006; Kawahara et al., 2009). Además, la administración directa en el AVT de antagonistas del GHSR bloquea el efecto orexigénico de la ghrelina administrada por vía sistémica (Abizaid et al., 2006). La actividad locomotora es otro comportamiento regulado por el circuito mesolímbico que se ha estudiado en relación al rol del sistema de ghrelina y GHSR. Se ha descrito que el circuito mesolímbico modula la actividad locomotora, en especial aquella relacionada a la obtención de recompensas naturales o artificiales (Amalric and Koob, 1993). Cuando se inyecta ghrelina por vía ICV a roedores, se observan aumentos en la actividad locomotora (Jerlhag et al., 2006, 2008). Lo mismo sucede cuando la ghrelina es administrada directamente en el AVT (Egecioglu et al., 2010; Jerlhag et al., 2006) y algunos estudios muestran que la administración sistémica de ghrelina aumenta la actividad locomotora de roedores (Disse et al., 2011; Jerlhag, 2008). Nuevamente, y como la hormona es capaz de inducir la liberación de dopamina por parte de las neuronas del AVT, este efecto de la ghrelina sobre la actividad locomotora se ha asociado a los aumentos en los niveles de dopamina en el NAcb. Sin embargo, las características neuronanatómicas de la acción de ghrelina sobre el AVT y su efecto en el NAcb no se encuentran completamente esclarecidos.

## **Metodologías para estudiar el sistema de ghrelina y GHSR en el cerebro**

Como se mencionó previamente, los mayores niveles de expresión del GHSR se dan en el cerebro, lo que lo convierte en el principal órgano blanco de la ghrelina. Sin embargo, la presencia del GHSR no es fácil de evidenciar usando técnicas de inmuno-detección debido a que pertenece a una familia de receptores acoplados a proteína G que presentan una alta homología estructural (Bockaert, 1999; Fredriksson et al., 2003). Así, la homología estructural del GHSR con otros receptores hace que los anticuerpos comerciales disponibles no resulten una herramienta confiable para la inmuno-detección del mismo en el tejido cerebral. De esta forma, la

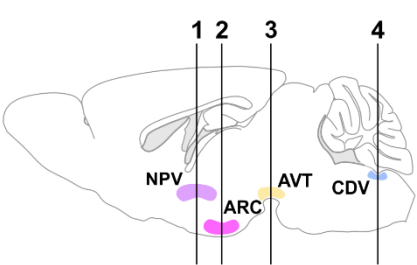
presencia del receptor de ghrelina se ha estudiado por métodos que involucran la detección del ARNm del GHSR, la detección de análogos de la ghrelina marcados de tal manera que permiten detectar la presencia del receptor por unión del ligando o modelos animales modificados genéticamente en los que se expresan proteínas reporteras bajo el control del promotor del gen del GHSR. De acuerdo a estudios realizados en roedores empleando inmuno-histoquímica de hibridación *in situ* (ISHH), los mayores niveles de ARNm del GHSR se dan a nivel del hipotálamo, particularmente en el ARC. También muestran niveles apreciables de expresión del GHSR el hipocampo, el AVT, la SN, el núcleo ambiguo y los núcleos cerebrales que componen el complejo dorsal del vago (Figura 1) (Zigman et al., 2006). Otros estudios han empleado análogos de ghrelina unidos a moléculas fluorescentes para inyectarlos a roedores por vía periférica y, en concordancia con los estudios de expresión del GHSR, muestran que la mayor señal detectada se localiza en el hipotálamo cerebral a nivel del ARC (Cabral et al., 2015; Schaeffer et al., 2013). De igual manera, estudios empleando ghrelina marcada radioactivamente mostraron altos niveles de unión de  $^{131}\text{I}$ -ghrelina a nivel cerebral en el hipotálamo (Diano et al., 2006).

Como se mencionó en el párrafo anterior, una forma de poner de manifiesto la presencia del GHSR es empleando un modelo de ratón modificado genéticamente en el que se expresa la proteína fluorescente verde (eGFP, del inglés *enhanced Green Fluorescent Protein*) bajo el control del promotor del gen del GHSR (ratones  $\text{Ghsr}^{\text{eGFP}}$ , (Mani et al., 2014)). Este modelo fue generado por el proyecto “Atlas de Expresión Génica del Sistema Nervioso”, en la Universidad Rockefeller, mediante inserción en el genoma del ratón de varias copias de un cromosoma bacteriano artificial que contiene el gen del GHSR modificado por inserción de la secuencia de eGFP en el sitio de inicio de la traducción. Este modelo murino ha sido caracterizado, en colaboración con nuestro laboratorio, para determinar el grado de concordancia entre la expresión de eGFP y la presencia del ARNm del GHSR en distintos núcleos cerebrales, detectada por ISHH (Mani et al., 2014). Los resultados de los estudios realizados mostraron la presencia de neuronas con señal de eGFP en núcleos cerebrales que se sabe que expresan el GHSR como el ARC, el hipocampo, el AVT, la SN y núcleos cerebrales situados en el bulbo raquídeo. En algunos de estos núcleos, la congruencia entre la señal de eGFP y la del ARNm del GHSR fue buena, entre ellos, el hipocampo (Mani et al., 2014). En núcleos cerebrales como el ARC, el AVT y la SN se detectaron bajos niveles de expresión de eGFP y de co-expresión de eGFP y del ARNm del receptor. Así, en el presente trabajo empleamos a los ratones  $\text{Ghsr}^{\text{eGFP}}$  para el estudio de los núcleos cerebrales del complejo dorsal del vago, ya que en ellos se detecta buena expresión de eGFP. El estudio de Mani et al. 2014 indica que la congruencia entre la señal del ARNm del GHSR y de eGFP es buena en el AP, pero sólo el ~50% de las neuronas eGFP del NTS presenta señal para el ARNm del GHSR. Como se mostrará más adelante, nuestro análisis de distintas técnicas de detección del GHSR indicó que los ratones  $\text{Ghsr}^{\text{eGFP}}$  son una herramienta útil para estudiar el rol del sistema de ghrelina y GHSR en los ambos núcleos cerebrales.

En cuanto al efecto de la ghrelina sobre sus distintos núcleos cerebrales blanco, una de las técnicas más empleadas para poner de manifiesto que las neuronas responden a la ghrelina (y a muchos otros estímulos también) es la inmuno-tinción contra c-Fos. c-Fos es un factor de transcripción que pertenece a la familia de



genes de expresión temprana. En particular, c-Fos es ampliamente empleado como marcador de activación transcripcional en neuronas ya que muestra bajos niveles basales en cerebros intactos y su detección puede ser combinada con la detección de otros marcadores (Kovács, 2008). Sin embargo, la ausencia de aumentos en los niveles de c-Fos no excluye la posibilidad de que las neuronas hayan efectuado una respuesta eléctrica o hayan liberado neurotransmisor. En contrapartida, la detección de aumentos en los niveles de c-Fos implica que la maquinaria transcripcional de las neuronas se ha puesto en marcha. Así, cuando aumenta el número de neuronas de un núcleo cerebral que expresa c-Fos en respuesta a un estímulo dado, se deduce que dicho núcleo cerebral participa en la respuesta al estímulo realizado. En nuestro laboratorio, empleamos la inmunotinción contra c-Fos de forma rutinaria para evidenciar la activación de un núcleo cerebral frente a un estímulo determinado. En relación a la ghrelina, se ha mostrado que su administración periférica a ratas aumenta el número de células que expresan c-Fos en el ARC (Hewson and Dickson, 2001). Resultados de nuestro laboratorio también muestran que la administración subcutánea de ghrelina a los ratones, además de provocar un aumento en la ingesta, aumenta el número de células que expresan c-Fos en el ARC de los animales (Figura 1, (Cabral et al., 2014)). En concordancia, este núcleo presenta los mayores niveles de expresión del GHSR y se encuentra en una posición estratégica para recibir información de factores circulantes (Cabral et al., 2015; Zigman et al., 2006). Cuando la ghrelina se administra directamente en el tercer ventrículo cerebral, además de inducir la ingesta de alimento y de aumentar el número de neuronas que expresa c-Fos en el ARC, aumenta el número de células que expresa c-Fos en otros núcleos cerebrales (Figura 1). Particularmente, se detectan aumentos de c-Fos en núcleos cerebrales situados en el tallo encefálico, entre ellos, el AVT, el AP y el NTS (Cabral et al., 2014). El hecho de que más núcleos cerebrales, además del ARC, aumenten los niveles de c-Fos en respuesta a ghrelina administrada por vía ICV muestra que la hormona provoca cambios en la actividad de núcleos cerebrales que no detectamos cuando la ghrelina es administrada por vía sistémica en nuestras condiciones experimentales. Además del aumento de c-Fos, la presencia del GHSR en el AVT, el AP y el NTS indica que la ghrelina puede afectar funciones mediadas por estos núcleos cerebrales. Es por ello que en este trabajo de Tesis decidimos estudiar el efecto de la hormona sobre los núcleos cerebrales situados en el tallo encefálico que responden con aumentos de c-Fos a la administración central de ghrelina, para poder esclarecer la base neuroanatómica y los efectos de la acción de la hormona sobre ellos.

	ARNm GHSR	c-Fos ghrelina SC	c-Fos ghrelina ICV
	-	-	+
	+	+	+
	+	-	+
	+	-	+

**Figura 1. Sistema de ghrelina y GHSR en distintos núcleos cerebrales blanco.** La figura muestra esquemas representativos de los distintos núcleos del cerebro de ratón que presentan expresión del GHSR y/o aumentan el número de células c-Fos+ en respuesta a ghrelina. En la primera columna, empezando por la izquierda, se muestra un corte sagital (primera fila) en el que se marcaron, con distintos colores y con líneas a la altura de los cortes coronales, los núcleos que se muestran en más detalle en las filas inferiores de acuerdo al Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001). La fila del corte 1 muestra el núcleo paraventricular (NPV) delineado en violeta, la fila del corte 2 muestra el núcleo arcuato (ARC) delineado en rosa, la fila del corte 3 muestra el área ventral tegmental (AVT) con sus 3 sub-núcleos delineados en amarillo (PBP), verde (PN) y verde azulado (IF) y la fila del corte 4 muestra el complejo dorsal del vago (CDV) con dos de sus núcleos delineados en celeste (NTS) y azul claro (AP). Al lado de todos los esquemas de cortes coronales se muestra, más pequeño, un esquema del corte coronal completo y se indica, en mm, la coordenada antero-posterior de acuerdo al Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001). En la segunda columna se indica con + aquellos núcleos que presentan expresión del ARNm del GHSR y con un - aquellos que no expresan el GHSR, de acuerdo a lo publicado en Zigman et al., 2006. En la tercera y cuarta columna se indica con un + aquellos núcleos en los que aumenta el número de células c-Fos+ y con un -, aquellos que no presentan diferencias en el número de células c-Fos+ en respuesta a la administración subcutánea y por vía ICV de ghrelina, respectivamente, de acuerdo a lo publicado en Cabral et al., 2014.

## OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue clarificar los circuitos neuronales del tallo encefálico que son regulados por la ghrelina y el GHSR. Más específicamente, los estudios se focalizaron en el complejo dorsal del vago, situado en el bulbo raquídeo, y el AVT del circuito mesolímbico, localizado en el mesencéfalo. Las dos regiones cerebrales se estudiaron de forma separada usando ratones como modelo experimental y, con fines organizativos, la investigación se abordó a través de dos objetivos independientes.

Objetivo 1: Estudiar los circuitos neuronales del complejo dorsal del vago que son regulados por la ghrelina y el GHSR, que incluyó los siguientes objetivos específicos:

1i - Determinar la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el complejo dorsal del vago.

1ii - Caracterizar fenotípicamente las neuronas del complejo dorsal del vago que expresan el GHSR.

1iii - Estudiar la respuesta de las neuronas del complejo dorsal del vago a aumentos en la concentración plasmática de ghrelina.

1iv - Estudiar las funciones moduladas por el sistema de ghrelina y GHSR a través de los núcleos del complejo dorsal de vago.

Objetivo 2: Estudiar las poblaciones neuronales del circuito mesolímbico que son reguladas por la ghrelina y el GHSR, que incluyó los siguientes objetivos específicos:

2i - Determinar la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el circuito mesolímbico.

2ii - Caracterizar fenotípicamente las neuronas del circuito mesolímbico que expresan el GHSR y son activadas por la ghrelina.

2iii - Estudiar el efecto de la administración sistémica de ghrelina sobre el circuito mesolímbico.

2iv - Estudiar las implicancias de la presencia del GHSR en las neuronas dopaminérgicas.

2v - Estudiar el rol del sistema de ghrelina y GHSR sobre la ingesta de alimento regulada por el circuito mesolímbico.

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 1. Animales experimentales

En el presente trabajo se utilizaron ratones macho adultos (2-5 meses de edad) de las siguientes cepas:

i-Ratones salvajes (*wild type*, WT) de la cepa C57BL/6J.

ii-Ratones deficientes del GHSR ( $Ghsr^{n/n}$ ). Estos animales fueron inicialmente generados en el laboratorio del Dr. Zigman de la *University of Texas-SouthWestern Medical Center* y poseen un casete de bloqueo de la transcripción (TBC, de sus siglas en inglés para *Transcription Blocking Cassette*) insertado entre el primer y el segundo exón del gen del GHSR, casete que se encuentra flanqueado por dos sitios loxP que son reconocidos por la recombinasa Cre para su escisión. Se utilizaron animales homocigotos que se obtuvieron por el cruzamiento entre animales heterocigotos con una base genética C57BL/6J.

iii-Ratones transgénicos en los que la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP, de *enhanced green fluorescent protein*) se expresa bajo el control del promotor del GHSR ( $Ghsr^{eGFP}$ ).

iv-Ratones transgénicos en los que la proteína fluorescente roja tdTomate se expresa en una subpoblación de neuronas GABA ( $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$ ). Estos animales se generaron por cruzamientos entre ratones  $Gad2^{cre/+}$  y ratones Ai14. Los ratones  $Gad2^{cre/+}$  son comercialmente provistos por *Jackson Laboratories* ( $Gad2^{tm1}(cre/ERT2)Zjh/J$ ; Stock# 010702) y expresan, luego de la inducción con tamoxifeno, la recombinasa Cre bajo el control del promotor endógeno del gen *Gad2* (Taniguchi et al., 2011). Los ratones Ai14 (*Allen Institute*, 129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAGtdTomato)Hze/J; Stock# 007908) poseen una mutación en el locus Gt(ROSA)26Sor con un casete STOP que previene la transcripción de tdTomate, la cual sólo se expresa luego de la recombinación mediada por la recombinasa Cre que elimina el casete de bloqueo de la transcripción (Madisen et al., 2010). Los animales utilizados se encontraban con una base genética C57BL/6J pura. Para lograr la recombinación mediada por Cre, ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  se inyectaron por vía intra-peritoneal (IP) por tres días consecutivos con tamoxifeno disuelto en aceite de sésamo (70 mg/kg peso corporal). Luego de tres semanas, el patrón de neuronas fluorescentes rojas fue similar al patrón de expresión de *Gad2*, como se ha mostrado en estudios previos (Taniguchi et al., 2011).

v-Ratones transgénicos en los que eGFP se expresa bajo el control del promotor del GHSR y, al mismo tiempo, tdTomate se expresa en una subpoblación de neuronas GABA (ratones  $Ghsr^{eGFP}$ - $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$ ). Estos animales se generaron por cruzamientos entre ratones  $Ghsr^{eGFP}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  y ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  y la inducción de la recombinasa se realizó de la misma forma que en el caso de los animales  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$ .

vi-Ratones transgénicos en los que tdTomate se expresa en neuronas dopaminérgicas ( $Dat^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$ ). Estos animales se generaron por cruzamientos entre ratones  $Dat^{cre/+}$  y ratones Ai14. Los ratones  $Dat^{cre/+}$  son

comercialmente provistos por *Jackson Laboratories* (B6.SJL-Slc6a3tm1.1(cre)Bkmn/J; Stock# 006660) y expresan de forma constitutiva el gen de la recombinasa Cre corriente abajo del gen del transportador activo de dopamina (DAT, de *dopamine active transporter*). Al ser cruzados con ratones Ai14, la recombinasa Cre expresada por las neuronas dopaminérgicas permite la expresión de la proteína fluorescente tdTomato en esta población neuronal.

vii-Ratones transgénicos con re-expresión selectiva del GHSR en neuronas dopaminérgicas (Dat<sup>cre/+</sup>-Ghsr<sup>n/n</sup>). Estos animales se generaron por cruzamientos entre ratones Dat<sup>cre/+</sup>-Ghsr<sup>n/+</sup> y ratones Ghsr<sup>n/n</sup>. La recombinasa Cre expresada en las neuronas dopaminérgicas de los ratones Dat<sup>cre/+</sup>-Ghsr<sup>n/n</sup> escinde el casete de bloqueo de la transcripción del gen del GHSR, permitiendo su transcripción y traducción específicamente en neuronas dopaminérgicas.

Todos los ratones que se utilizaron en este trabajo de Tesis se generaron en el bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE).

Los ratones se mantuvieron en cuartos con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (luz de 7:00 hs a 19:00 hs y oscuridad de 19:00 hs a 7:00 hs), a temperatura constante (22 ± 1 °C) con libre acceso a agua y alimento balanceado comercial para ratón (dieta estándar), excepto cuando se indique lo contrario. Los diferentes grupos experimentales se alojaron en jaulas colectivas, con no más de 5 animales por jaula, hasta 3 días antes del experimento correspondiente, siendo transferidos en ese momento a jaulas individuales.

Los animales se sacrificaron de acuerdo a las normas internacionales aceptadas del “*National Institutes of Health*” (NIH). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IMBICE (número de aprobación: 16-0112).

## **2. Dietas utilizadas**

En los experimentos que involucraron distintos tipos de dietas, se utilizaron dieta estándar y dieta de alto contenido graso (DACG), provistas por Gepsa (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina, [www.gepsa.com](http://www.gepsa.com)). La dieta estándar posee un valor energético de 2,5 kcal/g y su composición, en porcentaje respecto del peso, es la siguiente: 28,8% de carbohidratos, 25,5% de proteínas, 3,6% de grasas, 27,4% de fibras, 8,1% de minerales y 6,7% de humedad. Por otro lado, la composición de la DACG es la siguiente: 22,5% de carbohidratos, 22,8% de proteínas, 21,1% de grasas, 23,0% de fibras, 5,6% de minerales y 5% de humedad. Los principales componentes de la DACG son ácidos mono-insaturados (44,7%), ácidos saturados (29,8%) y ácidos poli-insaturados (20,9%), entre otros. Es importante remarcar que los pellets de dieta estándar y DACG son similares en su apariencia general (color, textura, etc.; (Valdivia et al., 2014)).

## **3. Reactivos**

– 3-3'-diaminobenzidina (DAB)/Solución de Níquel (Sigma Aldrich, cat # 32750).

- Aceite de sésamo (Farmacia homeopática).
- Alcoholes (Biopack).
- Anticuerpo anti-c-Fos generado en conejo (Santa Cruz, cat # SC-7202).
- Anticuerpo anti-cabra biotinilado (Vector Laboratories, cat # BA-1000).
- Anticuerpo anti-conejo biotinilado (Jackson Immuno Research Laboratories, cat # 711-065-152).
- Anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 594 (Invitrogen A21207 lote 52958A).
- Anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a Alexa 488 generado en cabra (Molecular Probes, cat # A-11096).
- Anticuerpo anti-pERK 1/2 generado en cabra (Santa Cruz Biotechnology, cat # SC-16982).
- Anticuerpo anti-ratón biotinilado (Vector Laboratories, cat # BA-9200).
- Anticuerpo anti-TH generado en conejo (Santa Cruz, cat # H-196).
- Anticuerpo anti-eGFP generado en conejo (Molecular Probes, cat # A-6455).
- Bálsamo de Canadá (Biopack).
- Buffer fosfato-salina (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) 0,01 M pH 7,4:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,9 g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,32 g/L y  $\text{NaCl}$  8,16 g/L (Biopack).
- Colchicina (Sigma-Aldrich, C2580000).
- DABCO (Sigma, lote 95H3458).
- Dietil-piropocarbonato (Sigma, cat # D5758).
- dNTPs (Invitrogen, cat # 10297018).
- D-Lys-GHRP-6 (Sigma, cat # G4535).
- EDTA.
- Formaldehído (Biopack).

- Flunixin meglumina (Flumeg, Over).
- Fluoresceína-Ghrelinina amidada con ácido n-octanoico (Gentileza del Dr. Luyt, University of Western Ontario).
- GelRed (Biotium, cat # 41001-41003-T).
- Ghrelin esterificada con ácido n-octanoico (Global Peptide, cat # PI-G-03).
- Glucosa (Biopack).
- Heparina (Calciparine, Sanofi Aventis).
- HOT FIREPol Eva Green Master Mix (Solis BioDyne).
- Insulina (Lilly, cat # U-100)
- K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> (Gentileza del Dr. Marie, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier).
- Ketamina (Holliday Scott SA).
- Kit comercial de complejo avidina-biotina-peroxidasa "VectaStain Elite ABC" (Vector Laboratories, cat # PK-6200).
- LiCl (Sigma-Aldrich, cat # 746460).
- RNase Out (Invitrogen, cat # 10777019).
- Sacarosa (Biopack).
- Suero Normal de Burro (Equitech-Bio.INC lote SD 30-2090).
- Tamoxifeno (Sigma, cat # T5648).
- TAQ Pegasus ADN polimerasa (EmbioTec, cat # EA00101- 500 U).
- Transcriptasa reversa M-MLV (Promega, cat # 9PIM170).
- Tritón-X100 (Biopack).
- TRIzol (Invitrogen, cat # 15596018).

– Xilacina (Richmond Vet Pharma).

## 4. Genotipado de animales

El genotipado de los ratones se llevó a cabo a partir de muestras de ADN obtenidas a partir de la cola de los animales. Brevemente, se corta un segmento de ~2 mm del extremo de la cola de los ratones al momento del destete (21 días de vida). Cada cola se recoge en un tubo eppendorf de 200 µL y se extrae el ADN mediante incubación durante 1 hora a 98°C en 75 µL de una mezcla de NaOH 25 mM con EDTA 0,2 mM. Luego de 1 hora, se enfría la mezcla a 15°C, se agregan 75 µL de Tris-HCl (pH 5,5) y se homogeneiza. Esta mezcla se puede emplear inmediatamente para realizar el genotipado o se puede conservar a -20°C hasta su procesamiento. Para llevar a cabo el genotipado se emplea la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés para *Polymerase Chain Reaction*). Para ello, se prepara la siguiente mezcla de reacción: 1,25 µL de buffer 10X; 0,625 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,25 µL de dNTPs 10 mM; 0,0625 µL de TAQ Pegasus ADN polimerasa 5 U/µL; 0,625 µL de primer forward 10 µM; 0,625 µL de primer reverse 10 µM; 1 µL de la mezcla de extracción del ADN y 8,06 µL de H<sub>2</sub>O. Los primers forward y reverse utilizados para cada genotipo de ratón se detallan en la Tabla 1. La mezcla se cicla en un termociclador con el siguiente protocolo: 4 min a 94°C; 35 ciclos de 30 seg a 94°C seguidos por 30 seg a 60°C y 45 seg a 72°C; 7 min a 72°C. Una vez terminado el ciclado, a cada tubo se le agregan 2,1 µL de una mezcla de buffer de carga con un colorante de ácidos nucleicos (GelRed®) y se homogeneiza. De esta mezcla, se siembran 6 µL en un gel de agarosa al 2% y se corre en una cuba electroforética durante ~1 hora a 90 V. El gel se revela en un transiluminador UV (Gel-Doc XR+, Bio-Rad) y, de acuerdo al patrón de bandas observado, se determina el genotipo de cada animal.

Modelo transgénico	Gen blanco	Alelo blanco	Primers	Producto
Ghsr <sup>eGFP</sup>	eGFP		Fwd: 5'-GGTCGGGGTAGCGGCTGAA-3' Rev: 5'-GGTCGGGGTAGCGGCTGAA-3'	330 pb
Ghsr <sup>n/n</sup>	Ghsr	WT	Fwd: 5'-GAGTGACAGGTAAGTGAGTGCG-3' Rev: 5'-GTGCGAACATTAGCGATGAAAGG-3'	184 pb
		TBC	Fwd: 5'-AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA-3' Rev: 5'-CCACTGCACGTCTCTCCCTATTT-3'	175 pb
Ai14	Rosa26	tdTomate	Fwd: 5'-ACGGCATGGACGAGCTGTAC -3' Rev: 5'-CAGGCGAGCAGCCAAGGAAA-3'	500 pb
Gad2 <sup>cre/+</sup>	Gad2	WT	Fwd: 5'-ACGTTTCCTGTCCCTGTGTG-3' Rev: 5'-CAGACGCTGCAGTCTTTTCAG-3'	507 pb
		Cre	Fwd: 5'-ACGTTTCCTGTCCCTGTGTG-3' Rev: 5'-AGGCAAATTTTGGTGACGG-3'	247 pb
Dat <sup>cre/+</sup>	Dat	WT	Fwd: 5'-TGGCTGTTGGTGTAAGTGG-3' Rev: 5'-GGACAGGGACATGGTTGACT-3'	264 pb
		Cre	Fwd: 5'-TGGCTGTTGGTGTAAGTGG-3' Rev: 5'-CCAAAAGACGGCAATATGGT-3'	152 pb



Tabla 2. Primers empleados en las PCR de genotipado de los modelos de ratones modificados genéticamente utilizados. En la columna del extremo derecho se muestran los respectivos tamaños de los productos de amplificación. *TBC*, casete de bloqueo de la transcripción.

## **5. Cirugías estereotáxicas**

Todas las cirugías las realizamos en el cuarto de cirugías del bioterio del IMBICE, con material de cirugía adecuado y en las condiciones de asepsia normalmente requeridas. En todos los casos utilizamos ratones anestesiados con una mezcla de Ketamina (150 mg/Kg de peso ip) y Xilacina (15 mg/Kg de peso ip).

*Implantación de cánula intra-cerebroventricular (ICV).* Para esta cirugía, primero se posicionó a los ratones en el aparato estereotáxico. Luego, se realizó un corte en la piel de la calota y se eliminaron las membranas que recubren el cráneo para poder visualizar el punto de bregma y establecer las coordenadas estereotáxicas del mismo. Una vez establecidas las coordenadas del bregma, se utilizaron las siguientes coordenadas para poder colocar una cánula guía permanente (4 mm de largo, calibre 22 G, *Plastics One*) dentro del ventrículo lateral del cerebro: -0,34 mm antero-posterior; +1,0 mm medio-lateral y -2,3 mm dorso-ventral siguiendo las coordenadas del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). En este lugar se perforó el cráneo, se colocó la cánula guía y se la fijó al hueso con cementante dental. Finalmente, se cerró la herida y se tapó el extremo libre de la cánula con un obturador adecuado. Después de la cirugía, los ratones se alojaron en jaulas individuales y se dejaron recuperar durante, al menos, 5 días. Para minimizar el estrés, los ratones fueron manipulados diariamente hasta el día experimental.

En todos los casos, se verificó la posición de las cánulas guía por análisis histológico de los cerebros *post-mortem*.

## **6. Procedimientos experimentales**

### ***6.1 Estudio de los circuitos neuronales del complejo dorsal del vago que son regulados por el sistema de ghrelina y GHSR.***

***6.1.1 Estudio de la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el complejo dorsal del vago.*** En el primer set de experimentos, se emplearon ratones  $Ghsr^{eGFP}$  (n=5) a los cuales se perfundió, se extrajeron sus cerebros, se congelaron y se cortaron en series coronales idénticas. Luego, una de las series de secciones coronales se sometió a una inmuno-tinción contra eGFP para estabilizar la señal y realizar un recuento de las neuronas eGFP presentes en el AP y el NTS. Los cortes coronales se montaron en cubreobjetos y se cubrieron con bálsamo de Canadá para realizar conteos de neuronas por visualización directa en un microscopio de campo claro.

Para el caso particular del NTS, se realizó un estudio detallado de la distribución de neuronas que expresan el GHSR mediante cuatro técnicas: 1) análisis del set de imágenes de ISHH contra GHSR disponible en la web del *Allen Mouse Brain Atlas*; 2) visualización directa de la fluorescencia de eGFP en muestras de cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$ ; 3) inmuno-tinción contra eGFP en muestras de cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  y 4) estudios

de pegado de un análogo de ghrelina en cerebros de ratones WT. Para el análisis, todas las imágenes se cargaron en el plugin TrakEM2 del software Fiji y se cuantificó el número de neuronas positivas (Schindelin et al., 2012). Las áreas correspondientes al NTS se delinearon de acuerdo a las coordenadas del atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001) y la descripción detallada de la neuroanatomía del NTS (Ganchrow et al., 2013).

El análisis de las neuronas que expresan el ARNm del GHSR se realizó empleando el set coronal de imágenes de la ISHH contra GHSR disponible en <http://mouse.brain-map.org/experiment/show/74511739> de la colección del *Allen Institute* (Lein et al., 2007). Se emplearon 19 imágenes de cortes que abarcaban la totalidad del NTS. Las imágenes corresponden a cortes coronales de cerebros de ratón de 25  $\mu\text{m}$  de espesor, separadas entre sí por 100  $\mu\text{m}$ .

Para el análisis de la distribución de neuronas eGFP en el NTS, se utilizaron las secciones coronales de los ratones  $\text{Ghsr}^{\text{eGFP}}$  perfundidos anteriormente. Se analizaron los cortes coronales sometidos a la inmuno-tinción anti-eGFP mediante microfotografías tomadas en un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse 50i), mientras que otra de las series se montó y se cubrió con medio de montaje para registrar las neuronas eGFP por fluorescencia directa con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus FV 1000, Japón).

La distribución de neuronas que unen ghrelina se realizó en cortes coronales de cerebros de ratones WT a los cuales se inyectó, por vía ICV, con 60 pmol/ratón de fluoresceína-ghrelina (F-ghrelina,  $n=6$ ). La F-ghrelina es un análogo de la hormona con una molécula de fluoresceína unida al C-terminal. La F-ghrelina se comporta de manera similar a la ghrelina y puede ser utilizada para estudiar tanto la unión como la captación de la hormona (Cabral et al., 2013). Vale resaltar que en el laboratorio de Neurofisiología hemos validado la especificidad de este trazador mostrando que la F-ghrelina: a) es bioactiva *in vivo*; b) marca el cerebro de ratón con un patrón similar al que se ha mostrado para la expresión del ARNm del GHSR; y c) no marca los núcleos cerebrales en animales deficientes en el receptor de ghrelina (Cabral et al., 2013). Para generar las muestras para el análisis de pegado de F-ghrelina, ratones WT se anestesiaron, se colocaron en el estereotáxico y se les inyectaron 60 pmol/ratón de F-ghrelina. A los 30 minutos pos-inyección, los ratones se perfundieron y se extrajeron sus cerebros. Luego, los cerebros se cortaron y una de las series de cortes coronales se sometió a una inmuno-tinción contra fluoresceína. Finalmente, se montaron los cortes y se microfotografiaron con un microscopio de campo claro.

Para realizar la reconstrucción volumétrica de la distribución de las neuronas eGFP en el NTS, se perfundieron ratones  $\text{Ghsr}^{\text{eGFP}}$  ( $n=2$ ) y sus cerebros se cortaron en seis series equivalentes de secciones coronales. Todas las series de cerebro se sometieron a una inmuno-tinción contra eGFP y se montaron en cubreobjetos. Cada serie se microfotografió a baja magnificación, para obtener la anatomía general del NTS, y a magnificación intermedia para resolver la distribución a nivel celular en las diferentes regiones del NTS. Luego, se empleó el programa Fiji para corregir las imágenes por campo plano y se ensamblaron en mosaicos de magnificación baja e intermedia. Para el análisis, los mosaicos de baja magnificación se cargaron de forma secuencial en el trakEM2 siguiendo su disposición rostro-caudal original (Schindelin et al., 2012). Luego, se registraron las

secciones para generar los mosaicos de magnificación intermedia, produciendo finalmente un volumen 3D completo de un segmento de la médula conteniendo una cobertura detallada de la totalidad del NTS. Más adelante, las áreas correspondientes al NTS se delinearon utilizando el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Finalmente, la posición de cada neurona eGFP dentro del volumen del NTS se anotó manualmente. Para estimar el número total de neuronas eGFP, todas las células conteniendo una tinción citoplasmática marrón fueron cuantificadas y el conteo se corrigió por el método de Abercrombie (Abercrombie, 1946). La distribución espacial resultante de las neuronas eGFP del NTS se analizó para detectar patrones de agrupamiento 3D empleando el algoritmo DBSCAN (Ester et al., 1996) a través del programa Fiji. Los parámetros del algoritmo utilizado para el agrupamiento fueron minPts=4 y Eps=60  $\mu$ m, basado en el análisis de la distribución de n-distancias y escaneos preliminares. Todas las estructuras y células delineadas se exportaron como modelos 3D y se importaron en Blender para realizar una representación volumétrica.

6.1.2 Caracterización del fenotipo neuronal presente en los núcleos del complejo dorsal del vago que expresan el GHSR. Para estudiar el fenotipo de las neuronas eGFP del complejo dorsal del vago se utilizaron tres sets independientes de ratones: a) un set de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  naïve (n=6); b) un set de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  (n=6) inyectados por vía ICV con colchicina (16  $\mu$ g en 4  $\mu$ L por ratón); y c) ratones  $Ghsr^{eGFP}$ - $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomato}$  naïve (n=5). Todos estos ratones se sacrificaron y perfundieron. Se obtuvieron los cerebros y se procesaron para ser sometidos a inmuno-tinciones contra diferentes marcadores neuronales. Las secciones de cerebro de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  naïve se sometieron a inmuno-tinciones fluorescentes contra tirosina hidroxilasa (TH) o contra colina acetil-transferasa (ChAT). Las secciones de cerebros de ratones tratados con colchicina se utilizaron para inmuno-tinciones fluorescentes contra NPY, contra pro-hormona liberadora de tirotrofina (pro-TRH) o contra Met-enkefalina. Las secciones de cerebros de los ratones  $Ghsr^{eGFP}$ - $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomato}$  se analizaron sin realizar ninguna inmuno-tinción. Todas las series se montaron y se cubrieron con medio de montaje para cuantificar las co-localizaciones con un microscopio confocal de fluorescencia.

Para corroborar que las neuronas eGFP del complejo dorsal del vago expresan el GHSR y responden a ghrelina, se mapeó la inducción de c-Fos en el AP y el NTS de animales  $Ghsr^{eGFP}$  inyectados con ghrelina por vía ICV. Para ello, un grupo de animales  $Ghsr^{eGFP}$  se implantó, mediante cirugía estereotóxica, con una cánula en el ventrículo lateral. Luego de siete días de recuperación de los ratones, los mismos fueron inyectados por vía ICV con 2  $\mu$ L de LCR artificial (LCRa) solo o conteniendo 300 pmol/ratón de ghrelina (n=6 por grupo). Utilizamos la dosis de 300 pmol/ratón por vía ICV ya que es la mínima dosis que induce la máxima respuesta orexigénica en nuestras condiciones experimentales. Dos horas después del tratamiento, los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  fueron anestesiados y perfundidos y se obtuvieron sus cerebros. Los mismos fueron cortados en secciones coronales que, posteriormente, se utilizaron para inmuno-tinciones cromogénicas dobles contra c-Fos y contra eGFP. La posición de las cánulas se corroboró *post-mortem* por análisis histológico de los cortes coronales de cerebro.

6.1.3 Estudio de la respuesta de las neuronas del complejo dorsal del vago a aumentos en la concentración plasmática de ghrelina. Para llevar a cabo uno de los sets de experimentos de este apartado, se inyectaron animales WT por vía subcutánea con F-ghrelina y luego se realizó un mapeo de la distribución de la señal de fluoresceína, así como de la inducción de pERK (de sus siglas en inglés para *phosphorylated extracellular signal-regulated kinases*) en el complejo dorsal del vago. Específicamente, se inyectaron animales WT por vía subcutánea con salina sola o conteniendo 300 pmol/g de peso corporal de F-ghrelina (n=4 vehículo y n=5 F-ghrelina). La dosis de F-ghrelina utilizada fue elegida ya que una dosis igual de ghrelina administrada por vía subcutánea causa incrementos en los niveles plasmáticos de ghrelina similares a los que se alcanzan cuando se somete a los animales a condiciones de déficit energético severas, como protocolos de restricción calórica crónica (Goldstein et al., 2011; Zhao et al., 2010). Treinta minutos después del tratamiento, los animales se perfundieron, los cerebros de los animales perfundidos se extrajeron y se cortaron en secciones coroneales que se usaron posteriormente para las inmuno-tinciones. Una de las series de cada animal se utilizó para la inmuno-tinción contra fluoresceína y otra de las series, para la inmuno-tinción contra pERK. Las series se montaron y se microfotografiaron con un microscopio de campo claro.

En otro de los sets de experimentos, se mapeó la inducción de c-Fos en el AP y el NTS de animales Ghslr<sup>eGFP</sup> inyectados con ghrelina por vía subcutánea. Para ello, un grupo de ratones Ghslr<sup>eGFP</sup> se inyectó por vía subcutánea con salina sola o conteniendo 300 pmol/g peso corporal de ghrelina (n=6 por grupo). Dos horas después del tratamiento, los ratones Ghslr<sup>eGFP</sup> fueron anestesiados y perfundidos y se obtuvieron sus cerebros. Los mismos fueron cortados en secciones coroneales que, posteriormente, se utilizaron para inmuno-tinciones dobles contra c-Fos y contra eGFP.

En un experimento independiente, se inyectaron ratones Gad2<sup>cre/+</sup>-Rosa26<sup>tdTomato</sup> por vía subcutánea con salina sola o conteniendo 300 pmol/g de peso corporal de ghrelina (n=3 vehículo y n=4 ghrelina) para corroborar el fenotipo neuronal que responde a la hormona. Dos horas después del tratamiento, los ratones se perfundieron, se extrajeron sus cerebros y se cortaron en series idénticas de secciones coroneales. Una de las series de secciones coroneales se sometió a una inmuno-tinción fluorescente contra c-Fos, se montaron los cortes y se microfotografiaron en un microscopio confocal de fluorescencia. En paralelo, una serie de secciones de los ratones Ghslr<sup>eGFP</sup> inyectados con ghrelina subcutánea del apartado anterior se empleó para realizar una inmuno-tinción cromogénica doble contra c-Fos y contra TH. Los cortes se montaron y se observaron en un microscopio de campo claro.

Finalmente, se mapeó la inducción de c-Fos en el AP y el NTS de ratones Ghslr<sup>eGFP</sup> ayunados. En particular, ratones Ghslr<sup>eGFP</sup> se mantuvieron alimentados *ad libitum* o se ayunaron (n=5 alimentados y n=6 ayunados) removiendo el alimento de las jaulas a las 10:00 am. Luego de 48 horas, los animales se pesaron, se perfundieron y se obtuvieron sus cerebros para realizar inmuno-tinciones cromogénicas dobles contra c-Fos y contra eGFP. Además, se colectaron muestras de sangre de la mejilla de los ratones inmediatamente antes de la perfusión para la determinación de niveles plasmáticos de glucosa, mediante el uso de un ensayo enzimático colorimétrico, y ghrelina, mediante un inmuno-ensayo enzimático, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al mismo tiempo, se disecó el tejido adiposo de los ratones perfundidos y se pesó. En un ensayo independiente,

se emplearon ratones WT que recibieron, o no (n=5 por grupo), fluidoterapia durante el ayuno mediante dos inyecciones diarias de salina estéril a temperatura corporal (0,01 mL/g de peso corporal). Los cerebros de estos ratones se obtuvieron luego de la perfusión y se procesaron como en los casos anteriores.

## 6.1.4 Estudio de las funciones moduladas por el sistema de ghrelina y GHSR a través del complejo dorsal del vago

### *6.1.4.1 Procedimientos experimentales para determinar el rol de las neuronas que expresan GHSR del AP.*

Con el objetivo de ablacionar el AP, se anestesiaron ratones WT y se les realizó una incisión entre la cresta occipital y la región medio-cervical. El foramen magnum se agrandó levemente para exponer el AP. El AP fue aspirada con una aguja 25G y se cerró la piel en uno de los grupos de ratones (AP-ablacionada), mientras que la piel fue suturada sin ninguna manipulación extra en el otro grupo de ratones (AP-intacta). Los ratones se trataron diariamente con flunixin meglumina (Flumeg 5%) por 4 días consecutivos pos-cirugía para reducir la inflamación y se mantuvieron con acceso *ad libitum* a dieta estándar y agua. Después de una semana, se ensayó la ingesta de dieta estándar inducida por ghrelina en un diseño contra-balanceado. En particular, los ratones se inyectaron por vía subcutánea con salina sola o conteniendo 300 pmol/g de peso corporal de ghrelina en un esquema alternado al azar en días consecutivos. La ingesta se calculó restando a la dieta inicial la dieta estándar remanente a las 2 horas luego del tratamiento. Después de 4 días de descanso de los ratones, se midió el vaciado gástrico utilizando el estándar de oro para estas mediciones, es decir, la técnica de rojo fenol (Shoji et al., 1997). Resumidamente, ratones alimentados *ad libitum* fueron administrados con 0,1 mL de la solución *test* (rojo fenol 0,5 mg/mL y glucosa 5% en agua) por gavage oral utilizando una sonda intra-gástrica con la punta en bulbo. Luego de 1 minuto, los ratones se inyectaron por vía subcutánea con salina sola o conteniendo 300 pmol/g de peso corporal. Pasados 20 minutos, los ratones se anestesiaron y se sacrificaron por decapitación. Se expusieron los estómagos de los ratones por laparotomía, se ligaron rápidamente en el píloro y en la unión esófago-estómago y se extrajeron. Los estómagos con sus contenidos se homogeneizaron en NaOH 0,1 N; las proteínas se precipitaron utilizando ácido tricloroacético al 20% y posterior centrifugación. Finalmente, los sobrenadantes se mezclaron con NaOH 4 M y se midió la absorbancia a 540 nm. El vaciado gástrico se expresó como porcentaje, el cual se calculó siguiendo la fórmula:  $[1 - (\text{absorbancia en estómago a testear/promedio de absorbancia inicial})] \times 100$ . La absorbancia inicial se obtuvo en un grupo independiente de ratones (n=3), los cuales se sacrificaron 1 minuto después de la administración de la solución *test* y sus estómagos fueron procesados como se describió anteriormente. Luego del ensayo de vaciado gástrico se removieron los cerebros de los ratones, se fijaron en formaldehído 4% *overnight* y se cortaron en 4 series coronales. Luego, una de las series se montó, se tiñó con tionina y se utilizó para estimar el grado de lesión del AP. Los ratones que presentaron ablaciones parciales del AP o ablaciones significativas del NTS se excluyeron del análisis. Luego de confirmar que los ratones tenían ablacionada completamente el AP, un total de 41 animales se incluyeron en el análisis y se agruparon de la forma siguiente: AP-intacta + vehículo (n=18), AP-intacta + ghrelina (n=12), AP-ablacionada + vehículo (n=5) y AP-ablacionada + ghrelina (n=6).

6.1.4.2 *Procedimientos experimentales en ratones Ghsr<sup>eGFP</sup> para determinar el rol de las neuronas eGFP del NTS.* En este caso, se utilizaron diferentes camadas de ratones Ghsr<sup>eGFP</sup> de entre 20 y 25 g de peso corporal que se alojaron en jaulas individuales y se expusieron a una serie de manipulaciones que se describen a continuación.

- **Ayuno/Re-alimentación.** Los ratones se ayunaron retirando el alimento de las jaulas a las 10:00 am, manteniendo acceso *ad libitum* al agua de bebida. 48 horas después, los ratones se perfundieron (n=5) o se re-alimentaron con un pellet previamente pesado de dieta estándar durante 2 horas (n=6). Pasadas las 2 horas de re-alimentación, los animales se sacrificaron y se perfundieron y la ingesta de dieta se cuantificó por pesada del pellet remanente. La longitud del ayuno empleado estuvo basada en estudios previos que muestran que un ayuno de 48 horas desencadena respuestas hiperfágicas más robustas y consistentes y que tanto el nivel de ARNm del GHSR como la sensibilidad central a la ghrelina es mayor en ratones ayunados por períodos largos de tiempo. Cabe destacar que el ayuno de 48 horas es una manipulación completamente tolerada por ratones WT que, además, muestran un estado de salud general bueno durante el ayuno (Fernandez et al., 2018).
- **Hiperfagia por exposición limitada e intermitente a DACG.** Ratones alimentados *ad libitum* se expusieron de forma diaria y por tiempo limitado (2 horas) a un pellet previamente pesado de DACG durante 4 días consecutivos (n=6). El consumo de DACG se controló y se verificó que aumentara a lo largo de los días, como se ha mostrado anteriormente (Valdivia et al., 2015). Los ratones control se expusieron a un pellet de dieta estándar (n=6). El consumo nocturno de dieta estándar se controló diariamente para todos los grupos experimentales. Todos los ratones se perfundieron el cuarto día experimental luego de las 2 horas de consumo de DACG o dieta estándar.
- **Distensión gástrica.** Los ratones se administraron por vía intra-gástrica por medio de gavage oral con 500  $\mu$ L de vaselina utilizando una sonda intra-gástrica (n=5). Los ratones control se expusieron al mismo procedimiento, pero sin infusión de vaselina (n=2). El gavage oral fue llevado a cabo por personal entrenado, como ya se ha realizado en estudios previos (Valdivia et al., 2014). Brevemente, se extendió la cabeza de los ratones hacia atrás para crear una línea recta a través del cuello y el esófago. El tubo de gavage se introdujo a través de la boca de los ratones avanzando suavemente a lo largo del paladar superior hasta el final del esófago. Los animales se habituaron al procedimiento por, al menos, 4 días previo al experimental realizando la maniobra para reducir el estrés. El día experimental, los ratones se perfundieron 2 horas después del procedimiento.
- **Malestar gastrointestinal inducido por administración de LiCl.** Ratones alimentados *ad libitum* se inyectaron con LiCl (12 mL/kg, 150 mM, IP, n=6) o salina (n=3). En estudios previos de nuestro laboratorio se ha mostrado que esta dosis de LiCl induce malestar en ratones, lo cual se evidencia a través del desarrollo de aversión condicionada al sabor cuando esta dosis de LiCl se aparea a un nuevo estímulo apetitivo (De Francesco et al., 2015).
- **Hipoglucemia inducida por administración de insulina.** Ratones saciados fueron inyectados con insulina (1,0 IU/kg BW, IP, n=6) o salina (n=4) de acuerdo a publicaciones anteriores (Enriori et al., 2007) y se

perfundieron 2 horas después del tratamiento. Los niveles de glucosa en sangre se midieron tomando muestras de sangre de la vena temporal superficial de la mejilla y usando un glucómetro (Accu-chek, Roche Diagnostic Corporation) inmediatamente antes y 30 minutos después de la inyección.

- Hiperglucemia inducida por administración de glucosa. Los ratones fueron ayunados por 24 horas removiendo el alimento de las jaulas a las 10:00 am. En la mañana del día experimental, los ratones fueron inyectados con glucosa (2 g/kg de peso corporal, IP, 50% p/v, n=7) o salina (n=4), de acuerdo a publicaciones anteriores (Enriori et al., 2007), y perfundidos 2 horas después del tratamiento. En este caso, la longitud del ayuno se utilizó de acuerdo a estudios previos que demuestran que los ratones ayunados por 24 horas presentan una variabilidad menor en los niveles de glucosa en sangre (Ayala et al., 2010). Los niveles de glucosa en sangre se midieron tomando muestras de sangre de la vena temporal superficial de la mejilla y usando un glucómetro, inmediatamente antes y 30 minutos después de la inyección.

## **6.2 Estudio de las poblaciones neuronales del circuito mesolímbico que son regulados por el sistema de ghrelina y GHSR.**

**6.2.1 Estudio de la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el circuito mesolímbico.** Para llevar a cabo estos experimentos, se inyectaron animales WT por vía ICV con F-ghrelina y luego se realizó un mapeo de la distribución de la señal de fluoresceína en el AVT y el NAc. Específicamente, se inyectaron animales WT por vía ICV con LCRa conteniendo 60 pmol/ratón de F-ghrelina (n=7). Treinta minutos después del tratamiento, los animales se perfundieron, los cerebros de los animales perfundidos se extrajeron y se cortaron en secciones coronales. Una de las series de cortes se usó para una inmuno-tinción contra fluoresceína. Los cortes se montaron en portaobjetos y se microfotografiaron empleando un microscopio de campo claro.

La distribución de neuronas que expresan el ARNm del GHSR se analizó en el set de imágenes coronales disponibles en <http://mouse.brainmap.org/experiment/show/74511739> de la colección del *Allen Institute* (Lein et al., 2007). Para el análisis del AVT, 6 imágenes fueron utilizadas. Estas imágenes corresponden a cortes coronales de 25 µm que están separadas una de otra por 100 µm.

**6.2.2 Caracterización del fenotipo neuronal presente en los núcleos del circuito mesolímbico que expresan el GHSR.** En este caso, se mapeó la inducción de c-Fos en las distintas subdivisiones del AVT y del NAc de animales WT previamente inyectados con ghrelina por vía ICV para confirmar la respuesta de las neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas a la presencia de ghrelina. Para ello, un grupo de animales WT se implantó, mediante cirugía estereotáxica, con cánulas ICV. Luego de 7 días de recuperación de los ratones, los mismos fueron inyectados por vía ICV con 2 µL de LCRa sólo (n=13) o conteniendo 300 pmol/ratón de ghrelina (n=23). Para el caso de las inyecciones ICV, como la ghrelina estimula el consumo de alimento y este proceso podría afectar la respuesta de los núcleos estudiados, los animales inyectados ICV se dividieron en dos grupos: un grupo con acceso a comida luego de la inyección (n=10 vehículo y n=13 ghrelina) y otro grupo sin acceso a comida luego de la inyección (n=3 vehículo y n=10 ghrelina). Como los animales inyectados con vehículo no

consumen alimento, se muestran en los Resultados como un único grupo inyectado con vehículo ICV. Luego de las inyecciones centrales, los ratones se dejaron (según correspondiera) con acceso a un pellet de dieta estándar pre-pesado y la ingesta de los animales se controló a los 30, 60 y 120 minutos pos-inyección por pesada del pellet remanente y diferencia de peso respecto del peso inicial. Dos horas después del tratamiento, los ratones fueron anestesiados y perfundidos y se obtuvieron sus cerebros. Los mismos fueron cortados en secciones coronales que, posteriormente, se utilizaron para inmuno-tinciones dobles contra c-Fos y contra TH. La posición de las cánulas se corroboró *post-mortem* por análisis histológico de los cortes coronales de cerebro.

En un set de experimentos independiente, se midió la actividad locomotora de ratones WT previamente inyectados con ghrelina por vía ICV con la finalidad de tener una indicción comportamental de la activación del circuito mesolímbico. Con tal fin, los ratones previamente implantados con cánulas ICV se transfirieron a jaulas de registro (19x28x13 cm) que se emplearon de forma exclusiva para cada ratón y se colocaron en una caja de filmación (55x35x90 cm) ventilada y acústicamente aislada. La actividad locomotora se ensayó en ratones alojados en jaulas individuales antes del experimento y que tenían acceso a dieta estándar y agua *ad libitum*, excepto cuando se transfirieron a las jaulas de registro. En las jaulas de registro no disponían de alimento ya que la interacción con el mismo, dada la acción orexigénica de la ghrelina, hubiera afectado su comportamiento. Antes de la medida de actividad locomotora, los animales se habituaron al ambiente de registro. Para ello, los ratones fueron transferidos de su jaula hogar (19x28x13 cm) a su jaula de registro exclusiva que, a su vez, se colocó dentro de la caja de filmación durante 1 hora por dos días consecutivos antes del día experimental. El primer día de habituación se agregó viruta autoclavada en cada jaula de registro, la cual se mantuvo a lo largo de los días del experimento. El día experimental, los ratones se transfirieron a sus jaulas de registro exclusivas y se colocaron en la caja de filmación; luego de 40 minutos, los ratones fueron inyectados por vía ICV con LCRa sólo o conteniendo 300 pmol/ratón de ghrelina. Las dosis para las dos vías fueron las mismas que las utilizadas para estudiar la inducción de c-Fos en el inciso anterior. En el caso de las administraciones ICV, las inyecciones se realizaron de acuerdo a un diseño contra-balanceado en que los ratones fueron inyectados el primer día con vehículo o ghrelina y, al día siguiente, con ghrelina o vehículo, respectivamente. Luego de cada tratamiento, se filmó a los ratones durante 35 minutos, con dos jaulas registradas en simultáneo. Los videos se importaron al software Fiji (Schindelin et al., 2012), se muestrearon a 8 cuadros por segundo y se procesaron utilizando un macro específicamente diseñado en el laboratorio para extraer la distancia total recorrida para cada ratón, la cual se expresó en metros.

Finalmente, para corroborar que las neuronas GABA del AVT también responden a la administración central de ghrelina, se implantaron ratones Gad2<sup>cre/+</sup>-Rosa26<sup>tdTomato</sup> con cánulas ICV. Luego de 7 días de recuperación de los ratones, los mismos fueron inyectados por vía ICV con 2 µL de LCRa sólo o conteniendo 300 pmol/ratón de ghrelina (n=6 vehículo y n=6 ghrelina). Dos horas después del tratamiento, los ratones fueron anestesiados y perfundidos y se obtuvieron sus cerebros. Los mismos fueron cortados en secciones coronales que, posteriormente, se utilizaron para inmuno-tinciones fluorescentes contra c-Fos. Los cortes se montaron en portaobjetos y se microfotografiaron con un microscopio de fluorescencia equipado con un módulo de



iluminación estructurada Apotome. La posición de las cánulas se corroboró *post-mortem* por análisis histológico de los cortes coronales de cerebro.

## 6.2.3 Estudio del efecto de la administración sistémica de ghrelina sobre los núcleos del circuito mesolímbico.

En este set de experimentos, se mapeó la inducción de c-Fos en las distintas subdivisiones del AVT y del NAc de animales WT previamente inyectados con ghrelina por vía subcutánea. Para ello, un grupo de ratones WT se inyectó por vía subcutánea con salina sola o conteniendo 60 pmol/g peso corporal de ghrelina ( $n=7$  vehículo y  $n=5$  ghrelina). En este caso, la dosis de ghrelina utilizada fue menor que la que utilizada en los experimentos anteriores ya que la misma induce aumentos confiables en la ingesta y en los niveles plasmáticos de ghrelina. Vale resaltar que no se realizaron comparaciones entre parámetros medidos en animales tratados con distintas dosis de ghrelina. Luego de las inyecciones, los ratones se dejaron con acceso a un pellet de dieta estándar pre-pesado y la ingesta de los animales se controló a los 30, 60 y 120 minutos pos-inyección por pesada del pellet remanente y diferencia de peso respecto del peso inicial. Dos horas después del tratamiento, los ratones fueron anestesiados y perfundidos y se obtuvieron sus cerebros. Los mismos fueron cortados en secciones coronales que, posteriormente, se utilizaron para inmuno-tinciones dobles contra c-Fos y contra TH. La posición de las cánulas se corroboró *post-mortem* por análisis histológico de los cortes coronales de cerebro.

En un set de experimentos independiente, se midió la actividad locomotora de ratones WT previamente inyectados con ghrelina por vía subcutánea. Se inyectaron 12 ratones con ghrelina o vehículo de acuerdo a un diseño contra-balanceado y las mediciones de actividad locomotora se realizaron como se describió anteriormente.

6.2.4 Estudio de las implicancias de la presencia del GHSR en neuronas dopaminérgicas. Para llevar adelante estos estudios, en primera instancia se utilizaron ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Rosa26}^{\text{tdTomato}}$  ( $n=2$ ) para corroborar la recombinación por parte de la recombinasa. Los ratones se perfundieron, se extrajeron sus cerebros y se cortaron en secciones coronales. Una de las series de secciones se utilizó para realizar una inmuno-tinción fluorescente contra TH. Los cortes se montaron en portaobjetos, se cubrieron con medio de montaje y se microfotografiaron para cuantificar el grado de co-localización entre TH y tdTomato.

A continuación, se utilizaron ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  para estudiar la re-expresión selectiva del GHSR en neuronas dopaminérgicas. Para ello, se sacrificaron ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  ( $n=4$ ), ratones WT ( $n=4$ ) y ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  ( $n=4$ ) por decapitación y se extrajeron sus cerebros frescos en un ambiente libre de ARNasas. Luego, los cerebros se colocaron en una matriz acrílica para realizar cortes de 1 mm de ancho. Los cortes se volcaron en una caja de Petri con una solución de dietilpirocarbonato 0,1% en PBS, se montaron en un portaobjetos, se secó el excedente de PBS y se congelaron colocándolos sobre hielo seco. Luego, se tomaron micro-disecciones con un punzón para biopsia de 1 mm de diámetro. Los núcleos que se micro-diseccionaron fueron el AVT y el ARC, siguiendo las coordenadas establecidas en el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Las micro-disecciones se recibieron en tubos con 200  $\mu\text{L}$  de TRIzol™ (Invitrogen) y más tarde se extrajo el ARN de las muestras usando el protocolo del TRIzol™. Una vez obtenido el ARNm, 500 ng del mismo se emplearon para obtener ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción

empleando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Promega). En primer lugar, se incubó el ARNm durante 5 min a 65°C con 1,8 µL de random primers (dil. 1:15) y la cantidad necesaria de H<sub>2</sub>O para alcanzar un volumen final de 10 µL. A continuación, se agregan 0,5 µL de inhibidor de RNAsas (RNase Out, Invitrogen), 4 µL de buffer para retrotranscripción 5X, 2µL de dNTPs, 1 µL de transcriptasa reversa y 12,5 µL de H<sub>2</sub>O para alcanzar un volumen final de 30 µL. Esta mezcla se calienta en horno de hibridación por 10 min a 25°C y luego por 60 min a 42°C. Pasado este tiempo, se agregan 30 µL de H<sub>2</sub>O para obtener un volumen final de 60 µL. Finalmente, el nivel del ARNm del GHSR se midió por PCR tiempo real empleando los oligonucleótidos forward 3'-ACCGTGATGGTATGGGTGTCG-5' y reverse 3'-CACAGTGAGGCAGAAGACCG-5' (Chuang et al., 2011) en un termociclador RotorGeneQ. Como gen constitutivo para normalizar los valores de ARNm se utilizó al gen de la proteína ribosómica L19. El ciclo umbral (Ct) de cada muestra y la eficiencia de cada reacción de qPCR se calcularon utilizando el programa de análisis Step One Software (Applied Biosystems). La eficiencia de las reacciones de qPCR se evaluó por el método de curva estándar, realizando la amplificación de seis diluciones seriadas de ADNc y posterior construcción de la recta Ct versus log de la dilución (eficiencia=10<sup>(-1/pendiente)</sup>-1). Los niveles de expresión de las muestras experimentales sobre los valores de los controles internos se calcularon para el GHSR utilizando el método de la curva estándar relativa.

En un set de experimentos independiente, se evaluó la respuesta de los ratones *Dat<sup>cre/+</sup>-Ghsr<sup>n/n</sup>* a administraciones de ghrelina. En primer lugar, se administraron ratones *Dat<sup>cre/+</sup>-Ghsr<sup>n/n</sup>* (n=11 vehículo y n=14 ghrelina), WT (n=9 vehículo y n=16 ghrelina) y *Ghsr<sup>n/n</sup>* (n=3 vehículo y n=3 ghrelina) por vía subcutánea con salina sola o conteniendo 60 pmol/g de peso corporal de ghrelina y se evaluó la ingesta en las dos horas pos-inyección. Para ello, luego de las administraciones subcutáneas, se les dio acceso a los animales a un pellet pre-pesado de dieta estándar. La ingesta se controló a los 30, 60 y 120 minutos pos-inyección por pesaje del pellet remanente y diferencia respecto del peso inicial.

Más adelante, luego de una semana de descanso, los ratones fueron implantados con cánulas ICV mediante cirugías estereotáxicas. Luego de los días de recuperación correspondientes, los ratones de los tres genotipos fueron inyectados con 2 µL de LCRa solo o conteniendo 60 pmol/ratón de ghrelina y se evaluó la ingesta de dieta estándar en respuesta a ghrelina, como ya se ha descrito previamente. Aquí, la dosis utilizada para las administraciones ICV nuevamente fue 5 veces menor que la utilizada en los experimentos anteriores en los que se inyectó ghrelina por vía ICV. De todas formas, la dosis de 60 pmol/ratón produce aumentos robustos en la ingesta, actividad locomotora y c-Fos en el ARC de los ratones. Los animales se volvieron a dejar descansar por una semana y se estudió la actividad locomotora de los ratones en respuesta a la administración ICV de ghrelina. En este caso, luego de haber habituado a los ratones al ambiente de medida de actividad locomotora, se inyectaron nuevamente por vía ICV con 60 pmol/ratón de ghrelina en un diseño contra-balanceado. El día experimental, los ratones fueron transferidos a las jaulas de registro y a la caja de filmación de actividad locomotora, como se explicó anteriormente, y luego de 40 minutos, se administraron con LCRa o ghrelina. Se filmaron por 35 minutos y luego se devolvieron a sus jaulas de vida.

En un set de animales independiente, se evaluó el perfil de ingesta de los ratones expuestos de forma limitada e intermitente a DACG. Para ello, ratones de los genotipos *Dat<sup>cre/+</sup>-Ghsr<sup>n/n</sup>* (n=21), WT (n=23) y *Ghsr<sup>n/n</sup>* (n=18)

se expusieron al protocolo de hiperfagia inducida por exposición limitada e intermitente a DACG previamente descrito y se evaluó el perfil de ingesta de los animales a lo largo de los 4 días de protocolo.

6.2.5 Estudio del rol del sistema de ghrelina y GHSR sobre la ingesta de alimento regulada por el circuito mesolímbico. El primer set de experimentos se realizó con el fin de estudiar el efecto de administraciones sistémicas diarias de ghrelina sobre el consumo de DACG de ratones expuestos por tiempo limitado y de forma intermitente a DACG. Para ello, animales WT se alojaron en jaulas individuales y se mantuvieron con acceso a dieta estándar y agua *ad libitum*. El protocolo de hiperfagia inducida por exposición a DACG fue similar al descrito previamente. En la mañana del día experimental y durante 4 días consecutivos, se les dio acceso a los animales (por 2 horas) a un pellet de DACG previamente pesado. Se controló la ingesta de DACG de los ratones a los 30, 60 y 120 minutos mediante el pesaje del pellet remanente y diferencia con el pellet ofrecido inicialmente. Los 4 días, inmediatamente antes del acceso a la DACG, un grupo de ratones se inyectó por vía subcutánea con salina (n=10), mientras que el otro grupo recibió inyecciones de 60 pmol/g peso corporal de ghrelina (n=9).

Luego, se realizó un set de experimentos independiente con el objetivo de estudiar el efecto de administraciones centrales diarias de ghrelina sobre el consumo de DACG de ratones expuestos por tiempo limitado y de forma intermitente a DACG. Para ello, animales WT se implantaron con cánulas en el ventrículo lateral y se alojaron en jaulas individuales con acceso a dieta estándar y agua *ad libitum*. En la mañana del día experimental y durante 4 días consecutivos, se les dio acceso a los animales (por 2 horas) a un pellet de DACG previamente pesado. Los 4 días, 20 minutos antes del acceso a la DACG, un grupo de ratones se inyectó por vía ICV con LCRa (n=9), mientras que el otro grupo recibió inyecciones de 300 pmol/ratón de ghrelina (n=15). Se controló la ingesta de DACG de los ratones a los 30, 60 y 120 minutos mediante el pesaje del pellet remanente y diferencia con el pellet ofrecido inicialmente.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos con el objetivo de estudiar el efecto de administraciones centrales diarias de moduladores de la actividad del GHSR sobre el consumo de DACG de ratones expuestos por tiempo limitado y de forma intermitente a DACG. Se realizaron dos sets de experimentos, uno en el que se inyectó a los ratones con D-Lys-GHRP-6, un antagonista del GHSR que bloquea la actividad evocada del GHSR, y otro set en el que se inyectó a los ratones con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>, un agonista inverso del GHSR que bloquea la actividad constitutiva del GHSR dejando intacta su actividad evocada por ghrelina. El D-Lys-GHRP-6 es una droga comercial que ha sido previamente utilizada en otros estudios (Asakawa et al., 2003) y la dosis elegida, 200 pmol/ratón, se basó en dichos estudios y en pruebas piloto de nuestro laboratorio que muestran que es la mínima dosis necesaria para reducir la ingesta inducida por administración central de ghrelina en un 42,4±4,0%. El K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> es una droga que fue específicamente diseñada en el laboratorio del Dr. Jacky Marie, que posee fluida interacción con nuestro laboratorio y se dedica al diseño de drogas moduladoras de la actividad del GHSR (M'Kadmi et al., 2015). La dosis elegida para las administraciones de K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>, 100 pmol/ratón, se basó en un trabajo previo (Els et al., 2012) y en pruebas de nuestro laboratorio que muestran que: (1) esa dosis reduce la ingesta nocturna durante la primera fase del período de oscuridad (de

18:00 a 23:00 hs) en ratones alimentados *ad libitum* cuando se administra la droga a las 18:00 hs ( $160,0 \pm 41,3$  mg vs  $669,0 \pm 123,7$  mg, respectivamente) y, (2) la misma dosis de K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> reduce la ingesta inducida por administración central de ghrelina en un  $81,0 \pm 5,6\%$ . Vale mencionar que la dosis empleada de K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> no afecta la ingesta nocturna de ratones Ghsr<sup>n/n</sup>. Para realizar las inyecciones previas a la ingesta de DACG, ratones WT se implantaron con cánulas en el ventrículo lateral y se alojaron en jaulas individuales con acceso a dieta estándar y agua *ad libitum*. En la mañana del día experimental y durante 4 días consecutivos, se les dio acceso (por 2 horas) a un pellet de DACG previamente pesado. En el primer set de experimentos, los 4 días, 20 minutos antes del acceso a la DACG, un grupo de ratones se inyectó por vía ICV con LCRa (n=6), mientras que el otro grupo recibió inyecciones de 200 pmol/ratón de D-Lys-GHRP-6 (n=8). En el segundo set de experimentos, los ratones se inyectaron con LCRa (n=6) o con 100 pmol/ratón K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> (n=12). Se controló la ingesta de DACG de los ratones a los 30, 60 y 120 minutos mediante el pesaje del pellet remanente y diferencia con el pellet ofrecido inicialmente.

## **7. Perfusión y procesamiento de muestras de cerebro**

Para realizar la fijación de las muestras de cerebro, se perfundió trans-cardialmente a los ratones con formaldehído al 4% como fijador. Para ello, se anestesió a los ratones y, una vez obtenido el nivel de anestesia necesario, se los sujetó en una mesa de cirugía por las extremidades con el abdomen hacia arriba. Luego, se realizó una incisión en la piel del abdomen de los ratones avanzando sobre la línea media torácica hasta las clavículas. Se realizaron dos incisiones laterales más, por debajo de las costillas, para exponer el campo torácico completo. El cartílago del proceso xifoideo se sostuvo con fórceps para acceder al corazón. Se conectó el sistema de perfusión directamente al ventrículo izquierdo del corazón con una aguja 22G. Inmediatamente después, se realizó un corte en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. Inicialmente, se perfundió a los ratones con una solución de lavado (PBS 0,01 M pH 7,4 conteniendo 10 UI/ml de heparina) a un flujo de 5 mL/minuto durante 2 minutos. Luego, se les perfundió fijador, formaldehído al 4%, durante 10 minutos a un flujo de 5 mL/minuto. Al finalizar la perfusión, se aislaron los cerebros y se pos-fijaron en solución de formaldehído al 4% durante 2 horas. Finalmente, se crio-preservaron mediante la incubación *overnight* en una solución de sacarosa al 20%. Al día siguiente, los cerebros de los ratones se congelaron en hielo seco y se cortaron en 4 series equivalentes de secciones coronales de 40 µm de espesor utilizando un crióstato. Para el caso de los cerebros extraídos de ratones inyectados con F-ghrelina, la crio-preservación se realizó en una solución de sacarosa al 20% más formaldehído al 1%. El procesamiento posterior se realizó de igual manera para todos los cerebros.

## **8. Inmuno-tinciones**

Todas las inmuno-tinciones se realizaron sobre secciones coronales de cerebro en flotación.

Para el caso de las inmuno-tinciones cromogénicas, una vez finalizadas, los cortes de cerebro se montaron en portaobjetos de vidrio positivados en orden antero-posterior, se deshidrataron y se los cubrió con medio de montaje (Bálsamo de Canadá) para observarlas al microscopio de luz blanca. En el caso de las inmuno-tinciones fluorescentes, los cortes montados se cubrieron directamente con medio de montaje (DABCO + Hoescht) para observarlas en el microscopio de fluorescencia.

Es importante destacar que se realizaron controles para todas las inmuno-tinciones, en los cuales se procesaron secciones de cerebro con los mismos protocolos que se describen a continuación para cada caso en particular, pero sin el agregado de anticuerpo primario o secundario.

*Inmuno-tinciones cromogénicas simples.* En primer lugar, se lavaron las secciones coronales 3 veces durante 10 minutos cada vez con PBS en agitación. Luego, se trataron con 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5% en PBS durante 30 minutos. Luego de otros tres lavados, se incubaron las secciones coronales de cerebro con solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% Triton-X en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario específico para cada inmuno-tinción, de acuerdo a las condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 3. Después de la incubación con anticuerpo primario, se realizaron otros tres lavados y se incubaron las secciones 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 3), disuelto en solución bloqueante. Más adelante, se realizaron otros 3 lavados y se incubaron las secciones coronales durante 1 hora con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada. Finalmente se reveló la reacción con el sustrato 3,3'-diaminobencidina comercial en presencia o ausencia de NiCl<sub>2</sub>, lo cual produjo un precipitado negro-violáceo o marrón, respectivamente. El tiempo de revelado para cada inmuno-tinción cromogénica se encuentra especificado en la Tabla 2.

Anticuerpo primario	Concentración	T de incubación	t de incubación	Anticuerpo secundario	t de revelado
$\alpha$ -c-Fos	1:1.000 (cromogénica)	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo biotinilado	8 min
$\alpha$ -c-Fos	1:1.000 (fluorescente)	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo Alexa488	2 hs
$\alpha$ -ChAT	1:20.000	TA	<i>Overnight</i>	$\alpha$ -cabra Alexa594	2 hs
$\alpha$ -eGFP	1:20.000	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo biotinilado	10 min
$\alpha$ -Fluoresceína	1:1.500	4°C	48 hs	$\alpha$ -cabra biotinilado	7 min
$\alpha$ -M-encefalina	1:10.000	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo Alexa594	2 hs
$\alpha$ -NPY	1:7.000	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo Alexa594	2 hs
$\alpha$ -pERK	1:500	TA	<i>Overnight</i>	$\alpha$ -cabra biotinilado	10 min
$\alpha$ -pro-TRH	1:3.000	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo Alexa594	2 hs
$\alpha$ -TH	1:20.000 (cromogénica)	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo biotinilado	10 min
$\alpha$ -TH	1:5.000 (fluorescente)	4°C	48 hs	$\alpha$ -conejo Alexa594	2 hs

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados con sus respectivas condiciones de uso.**

*Immuno-tinciones cromogénicas dobles.* Las immuno-tinciones dobles se realizaron incubando en primer lugar con el anticuerpo que reconoce antígenos nucleares (en nuestro caso, c-Fos) y, luego, con el anticuerpo que reconoce antígenos citoplasmáticos (en nuestro caso, eGFP y TH). Se llevó a cabo la primera immuno-tinción como se describió en el apartado anterior y, después del revelado, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó nuevamente a las secciones coronales, el tiempo indicado, con anticuerpo primario disuelto en solución bloqueante. A continuación, se incubó con anticuerpo secundario, con complejo avidina-peroxidasa biotinilada y se reveló la reacción como se detalló anteriormente. En nuestro caso, las immuno-tinciones nucleares se revelaron con el agregado de  $\text{NiCl}_2$ , mientras que las immuno-tinciones citoplasmáticas se revelaron en ausencia de  $\text{NiCl}_2$ , de modo que se generó un precipitado nuclear negro-violáceo y un precipitado citoplasmático marrón.

*Immuno-tinciones fluorescentes simples.* Para el caso de las immuno-tinciones fluorescentes, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Luego, las secciones coronales fueron tratadas con la misma solución bloqueante descrita previamente durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante dos días a 4°C. A continuación, los cortes se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo por 2 horas a temperatura ambiente.

## **9. Análisis neuroanatómico cuantitativo**

El análisis neuroanatómico cuantitativo fue realizado de forma independiente por dos observadores bajo las mismas condiciones ópticas, en una de cada cuatro series de secciones coronales completa. Los límites anatómicos de cada región cerebral analizada se identificaron usando el atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). De esta forma, los conteos se realizaron en secciones comprendidas entre los bregmas que se detallan a continuación para cada núcleo estudiado:

NAcb: entre bregma 0,86 mm y bregma 1,18 mm;

ARC: entre bregma -1,34 mm y bregma -1,94 mm;

AVT: entre bregma -3,28 mm y bregma -3,88 mm;

NTS: entre bregma -6,24 mm y bregma -8,00 mm;

AP: entre bregma -7,20 mm y bregma -7,76 mm.

Para el análisis, además, el NAcb se subdividió en NAcbC, NAcbShM y NAcbShL (Ikemoto, 2007; Kelley, 2004), mientras que el AVT se subdividió en 5 sub-núcleos: núcleo IF, núcleo PN, núcleo PBP, núcleo RL y núcleo CL (Ikemoto, 2007; Sanchez-Catalan et al., 2014).

Para determinar el número total de células inmuno-reactivas para los antígenos marcados en cada región cerebral, se cuantificaron las células que contenían precipitado negro/violáceo o marrón a través de todo el núcleo. El total de neuronas inmuno-reactivas para cada antígeno se contó en las diferentes subregiones de los núcleos antes mencionados. Los datos se expresan como:

- El número total de células inmuno-reactivas en cada área cerebral, el cual fue calculado a partir de la fórmula de Konigsmark. En ésta, el total de células es igual al número de células contadas multiplicada por el total de secciones comprendidas dentro del núcleo y dividida por el número de secciones en las que se realizaron los recuentos (Konigsmark, 1970). En todos los modelos animales empleados, el número total de neuronas inmuno-reactivas se cuantificó usando la misma estrategia. Todos los análisis fueron corregidos por doble conteo de acuerdo al método de Abercrombie (Abercrombie, 1946), en el cual el número total de células se multiplica por un factor de corrección igual al espesor de la sección dividido por la suma entre el espesor de la sección y el diámetro promedio de la célula o del núcleo. Para obtener este último dato, se cuantificaron al menos 40 células o núcleos en cada área cerebral y condición experimental utilizando el software Fiji.
- El porcentaje de células positivas respecto de una población total. El cálculo se realizó dividiendo el total de células inmuno-reactivas para uno o dos marcadores (dependiendo el caso) por el total de células inmuno-reactivas para alguno de los dos marcadores en cada corte cuantificado. Luego, se promedió el valor encontrado por animal y, finalmente, los valores mostrados son el promedio de los valores de los distintos animales experimentales. En este caso, también realizó la corrección de Abercrombie.

La nomenclatura empleada para identificar a las distintas poblaciones neuronales para los análisis cuantitativos fue la siguiente:

- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para c-Fos se denotan como cFos+.
- Las células que presentaban señal de fluorescencia endógena de eGFP o que se detectaron por inmunotinción utilizando un anticuerpo anti-eGFP se denotan como eGFP+.
- Las células que presentaron señal de fluorescencia endógena de eGFP o que se detectaron por inmunotinción utilizando un anticuerpo anti-eGFP que, además, presentaron señal inmuno-reactiva para c-Fos se denotan como c-Fos+/eGFP+.
- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para c-Fos, pero no mostraron señal fluorescente endógena o inmuno-reactiva de eGFP se denotan como c-Fos+/eGFP-.
- Las células que presentaron señal de fluorescencia endógena de tdTomate se denotan como tdTomate+.
- Las células que presentaron señal fluorescencia endógena de tdTomate que, además, presentaron señal inmuno-reactiva para c-Fos se denotan como c-Fos+/tdTomate+.
- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para c-Fos, pero no mostraron señal fluorescente endógena de tdTomate se denotan como c-Fos+/tdTomate-.
- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para fluoresceína se denotan como fluoresceína+.
- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para pERK se denotan como pERK+.
- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para TH se denotan como TH+.
- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para c-Fos que, además, mostraron señal inmuno-reactiva para TH se denotan como c-Fos+/TH+.
- Las células que presentaron señal inmuno-reactiva para c-Fos, pero no mostraron señal inmuno-reactiva para TH se denotan como c-Fos+/TH-.

Para la estimación cuantitativa de la densidad de señal para fluoresceína y para pERK, se obtuvieron imágenes con un objetivo 10x del NTS y del AP con señal para fluoresceína o pERK en áreas comparables y bajo las mismas condiciones ópticas y de luz. Las microfotografías se transformaron a imágenes de 8 bits en escala de grises y se midió la densidad óptica (DO) promedio para cada imagen usando el software Fiji. La medida de la DO para cada imagen es el promedio gris de los píxeles de acuerdo a una escala de 256 grises como referencia. Se determinó el *background* no específico en el cerebro medio dorsal, en donde no se encontró señal IR para fluoresceína o pERK. El valor de DO para cada imagen se corresponde con la densidad promedio de señal IR para fluoresceína o pERK menos el *background* respectivo del nivel de señal de la muestra.

## **10. Obtención de imágenes**

Las imágenes fluorescentes las adquirimos empleando un microscopio Zeiss AxioObserver D1 equipado con un módulo de iluminación estructurada Apotome 2 y una cámara monocroma Axiocam 506 o un microscopio confocal Olympus FV 1000, dependiendo el caso. Fluoresceína y el fluoróforo Alexa 488 fueron excitados a 488 nm, mientras que tdTomate y el fluoróforo Alexa 594 fueron excitados a 594 nm. Todas las Imágenes de



campo claro las adquirimos a baja y alta magnificación, 20x y 100x respectivamente, usando un microscopio Nikon Eclipse 50i y una cámara digital Nikon DS-Ri1, en 8 bits y en formato tif.

Utilizamos dos programas de edición de imágenes, Fiji y Corel Draw X7 para ajustar el tamaño, contraste y brillo de las microfotografías, y Fiji para cuantificar la DO.

## **11. Análisis estadístico**

El análisis se realizó con el programa GraphPad Prism 6.0. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratones WT provenientes de cruza entre ratones WT y los ratones WT provenientes de cruza de animales heterocigotas para otros genotipos en ninguna de las mediciones realizadas, por lo que los mismos fueron agrupados en los distintos análisis. Para los análisis estadísticos que involucraban dos grupos experimentales, se utilizó el test t de Student, para datos con distribuciones normales, o el test de Mann-Whitney, para el caso de datos con distribuciones distintas a la normal. Para el análisis de más de dos grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey o Bonferroni, cuando las distribuciones de datos eran normales, o el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn, cuando las distribuciones de datos no seguían una distribución normal. El análisis de normalidad se realizó mediante la aplicación del test de D'Agostino-Pearson y el de igualdad de varianzas se realizó mediante el test de Bartlett.

## RESULTADOS

Como se describió en la Introducción de este trabajo, cuando la ghrelina se administra por vía subcutánea induce un aumento en el número de células que expresa c-Fos exclusivamente en el ARC. Cuando la hormona se inyecta ICV, también aumenta el número de células que expresa c-Fos en otras áreas del cerebro, incluyendo el AP, el NTS y el AVT. La acción de la ghrelina a nivel del ARC se encuentra ampliamente estudiada, ya que este núcleo cerebral se considera uno de los principales orquestadores del balance energético de los organismos. En el presente trabajo de Tesis decidimos focalizarnos en el estudio del rol modulador de la ghrelina sobre los núcleos cerebrales que expresan el GHSR situados en el tallo encefálico, entre ellos, el AP, el NTS y el AVT, en los que aumenta el número de células que expresa c-Fos en respuesta a la administración central de ghrelina y en los cuales no se ha estudiado con detalle la base neuroanatómica de los efectos de la ghrelina.

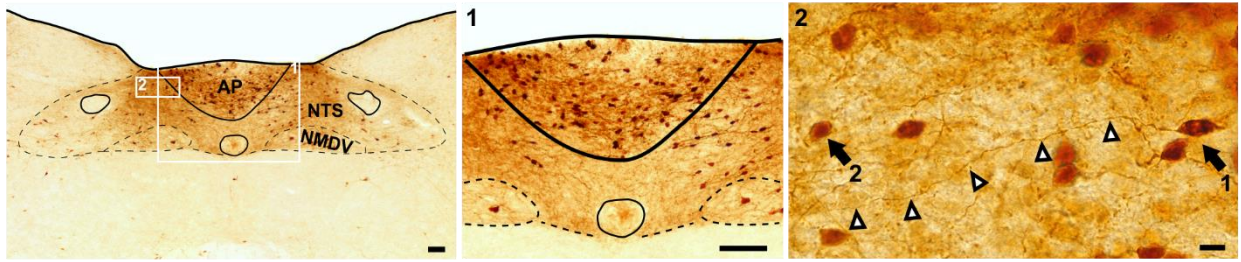
En primer lugar, nos centramos en el estudio del rol de la ghrelina y el GHSR como moduladores de la actividad de los circuitos neuronales sensibles a ghrelina presentes en el bulbo raquídeo. Así, la primera parte de esta sección muestra los resultados de los experimentos realizados para estudiar el rol de la ghrelina y el GHSR en el complejo dorsal del vago. Similar a lo puntualizado en los objetivos específicos del presente trabajo, se muestran los resultados del análisis neuroanatómico, fenotípico y funcional de la acción del sistema de ghrelina y GHSR en los núcleos cerebrales que conforman el complejo dorsal del vago. En la segunda parte de la presente sección, se presentan los resultados relacionados al estudio del efecto de la ghrelina y el GHSR sobre el circuito mesolímbico. Nuevamente, se muestran los resultados de estudios neuroanatómicos, fenotípicos y funcionales realizados con el objetivo de esclarecer el rol del sistema de ghrelina y GHSR en el circuito mesolímbico. En este caso particular, el análisis funcional incluyó la utilización de un modelo de ratón modificado genéticamente que expresa el GHSR exclusivamente en neuronas dopaminérgicas y el uso de un protocolo de atracón previamente caracterizado en nuestro laboratorio, en cuya regulación se sabe que participan el sistema de ghrelina y GHSR y el circuito mesolímbico.

## Estudio de los circuitos neuronales del complejo dorsal del vago que son regulados por el sistema de ghrelina y GHSR

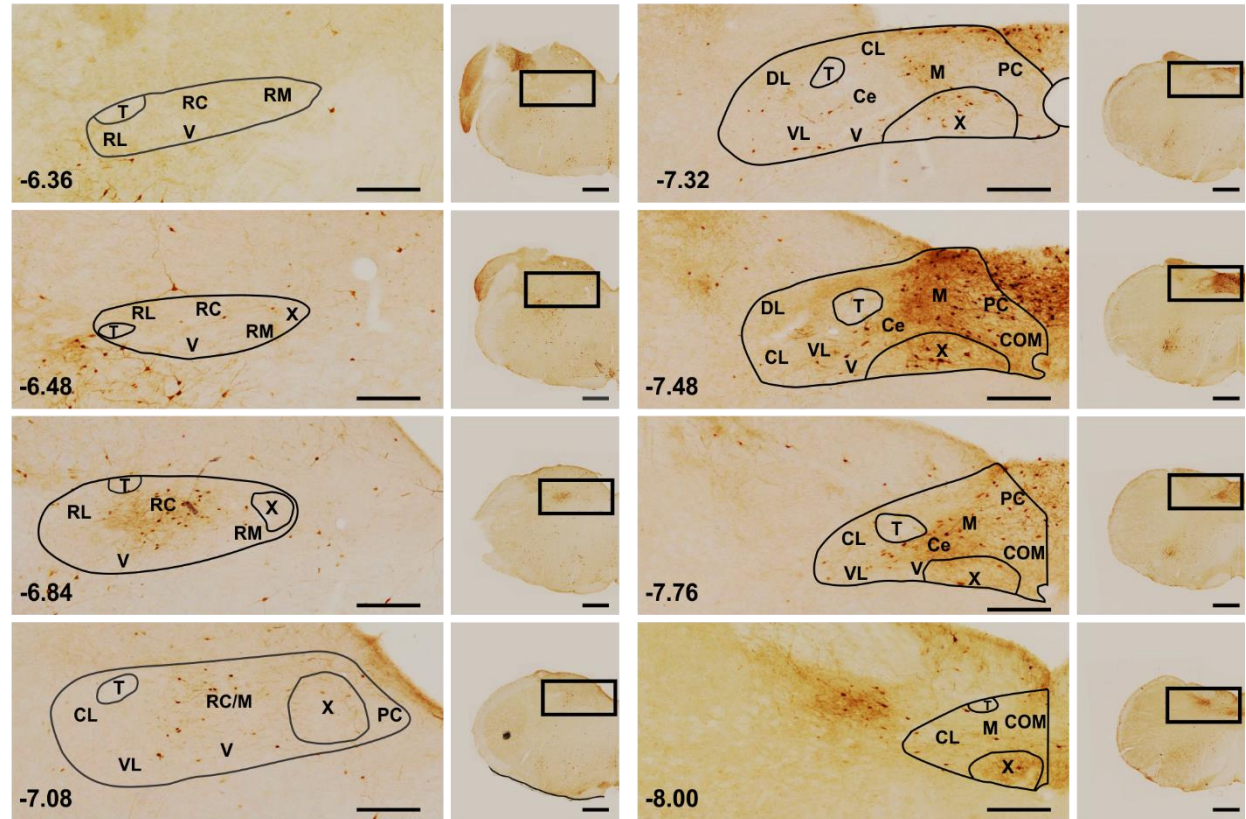
### 1. Estudio de la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el complejo dorsal del vago

En primer lugar, realizamos un análisis detallado de la presencia de neuronas que expresan el GHSR en el complejo dorsal del vago. Para ello, utilizamos ratones de la cepa  $Ghsr^{eGFP}$  que permiten la visualización directa de las neuronas que expresan el GHSR. Las neuronas que expresan eGFP de estos animales se pueden visualizar mediante fluorescencia propia del eGFP o se puede realizar una inmuno-tinción contra eGFP para estabilizar la señal y poder realizar análisis cuantitativos más detallados. Tanto la visualización directa de fluorescencia como la inmuno-tinción contra eGFP muestran un patrón neuroanatómico similar de señal (Mani et al., 2014). En primer lugar, se realizaron inmuno-tinciones contra eGFP en cortes coronales de cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  y se cuantificó el número de neuronas eGFP+ en el AP y en el NTS. En el caso del AP, el análisis cuantitativo arrojó un total de  $837 \pm 74$  neuronas eGFP+, las cuales presentaron un diámetro promedio de  $9,2 \pm 0,2 \mu m$  y se encontraron concentradas en el volumen del AP (Figura 2A). Una característica particular de las neuronas eGFP+ del AP es que la mayoría presentaron una proyección ventro-lateral en dirección al NTS en el plano coronal (Figura 2A). En el caso del NTS, se cuantificaron un total de  $\sim 1800$  neuronas eGFP+ a lo largo del núcleo, con un diámetro promedio de  $8,4 \pm 0,2 \mu m$  y dos a tres prolongaciones ramificadas de longitudes de entre 17 y 45  $\mu m$  en el plano coronal (Figura 2B y 2C).

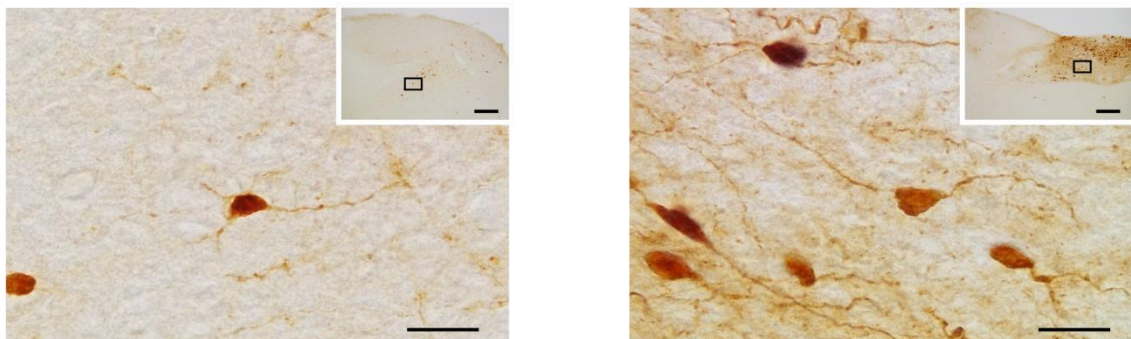
**A**



**B**



**C**

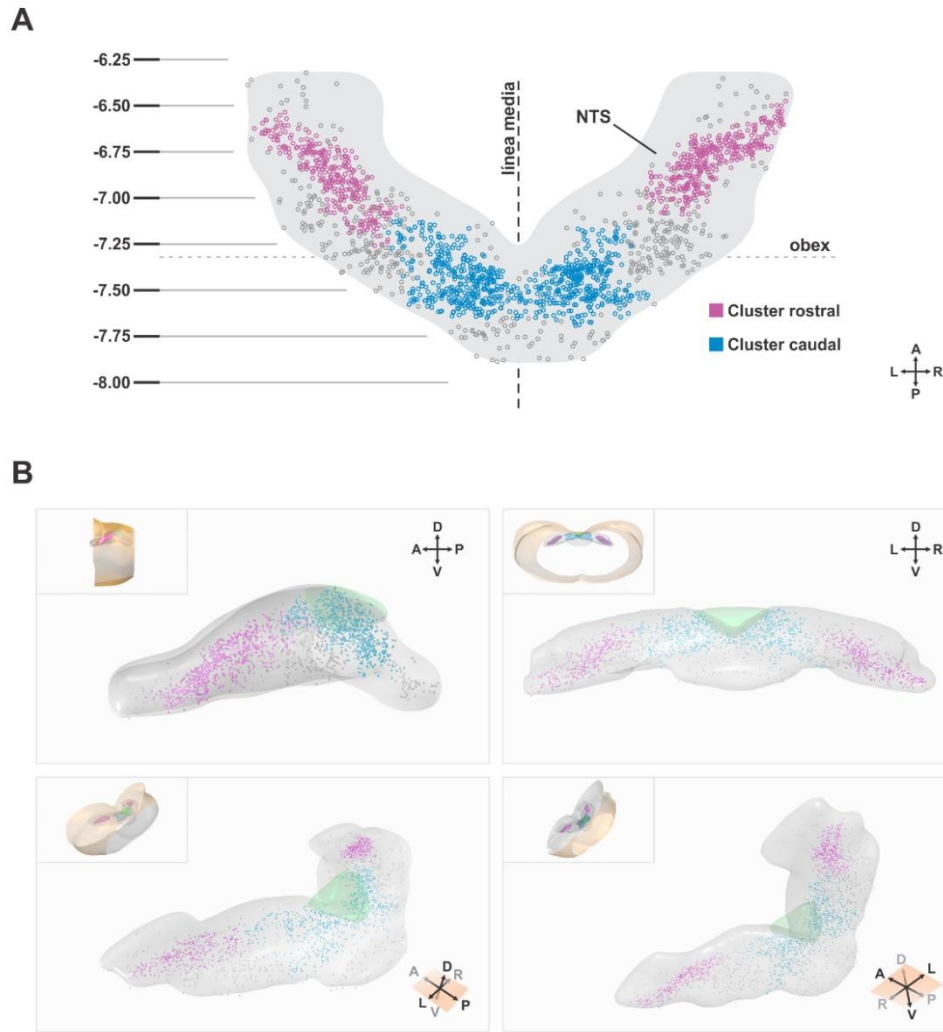


**Figura 2. Las neuronas eGFP+ se encuentran tanto en el AP como el NTS.** El Panel A muestra microfotografías de un corte coronal del cerebro de un ratón  $Ghsr^{eGFP}$  sometido a una inmunotinción contra eGFP. La imagen a la izquierda muestra una microfotografía a baja magnificación mostrando la presencia de neuronas eGFP+ en los tres núcleos del complejo dorsal del vago. En la imagen se agregó un esquema de la división de los núcleos del complejo dorsal del vago de acuerdo al Atlas del Cerebro de Ratón de Paxinos y Franklin (2001). La imagen del medio muestra, en magnificación intermedia, el área delimitada por el rectángulo 1 en la imagen de baja magnificación. La

imagen de la derecha muestra, en alta magnificación, el área de la imagen de baja magnificación contenido por el rectángulo 2. La flecha 1 apunta a una neurona eGFP+ del AP que envía una proyección ventro-lateral hacia el NTS, la flecha 2 apunta a una neurona eGFP+ del NTS y las puntas de flecha marcan el recorrido de la proyección de la neurona eGFP+ del AP. Barras de escala: 200  $\mu$ m, baja magnificación; 100  $\mu$ m, magnificación intermedia y 10  $\mu$ m, alta magnificación. El **Panel B** muestra una serie antero-posterior de imágenes a magnificación intermedia y baja del NTS de cortes coronales del cerebro de un ratón Ghr<sup>eGFP</sup> sometido a una inmuno-tinción anti-eGFP. En cada caso, se delimitó con un rectángulo negro en la imagen de baja magnificación la zona mostrada en la imagen de magnificación intermedia. A las imágenes de magnificación intermedia se les superpuso un esquema con la delimitación de los distintos sub-núcleos del NTS según Gachrow et al., 2013. La columna de imágenes de la izquierda muestra imágenes de la zona anterior del NTS, mientras que la columna de la derecha muestra imágenes de la región posterior del NTS. En todos los casos, la coordenada antero-posterior según bregma está indicada en mm. Barras de escala: 500  $\mu$ m, magnificación baja y 200  $\mu$ m, magnificación intermedia. El **Panel C** muestra microfotografías de ejemplos de neuronas “ovoides” del NTS de un ratón Ghr<sup>eGFP</sup> sometido a una inmuno-tinción anti-eGFP. Las imágenes de alta magnificación provienen de la zona delimitada con un rectángulo negro en las imágenes de baja magnificación. Barras de escala: 20  $\mu$ m, baja magnificación y 200  $\mu$ m, alta magnificación. Ce sub-núcleo central, CL sub-núcleo caudal lateral, COM sub-núcleo comisural, DL sub-núcleo dorsal lateral, M sub-núcleo medial, PC sub-núcleo parvicelular, RC sub-núcleo rostral central, RL sub-núcleo rostral lateral, RM sub-núcleo rostral medial, V sub-núcleo ventral, VL sub-núcleo ventral lateral, T tracto solitario.

Particularmente para el NTS, estudiamos si las neuronas eGFP+ se agrupaban de modo diferencial a lo largo del núcleo. Este tipo de análisis se realizó dado que las neuronas que conforman el NTS se disponen a lo largo del núcleo de acuerdo a la función que regulan. Las neuronas localizadas en la parte rostral del NTS controlan procesos asociados a la parte superior del sistema digestivo a través de las innervaciones principalmente gustatorias, mientras que las neuronas localizadas en la parte caudal del NTS controlan procesos relacionados con la parte inferior del sistema digestivo a través de innervaciones vagales (King, 2007). Así, se realizó un análisis de agrupamiento espacial de las neuronas eGFP+ del NTS de acuerdo a sus coordenadas tridimensionales de localización (rostro-caudal, dorso-ventral, y medio-lateral) dentro del núcleo. Para ello, empleamos el algoritmo DBSCAN (de sus siglas en inglés para *Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise*, (Ester et al., 1996)), el cual se basa en el agrupamiento de puntos mediante su clasificación entre las categorías de “puntos centrales”, “puntos borde” y “puntos ruido”. Esta clasificación y agrupamiento es alcanzado en tres pasos: en primera instancia, el algoritmo calcula la densidad (número) de puntos que rodea a cada uno dentro de un cierto radio (“Eps”). Todos los puntos que estén rodeados por al menos una cantidad umbral de puntos vecinos (“minPts”) se clasifican como puntos centrales. Luego, se vuelve a revisar el conjunto de puntos remanentes. Si un punto se encuentra dentro de un radio Eps de un punto central (y viceversa, por simetría), se lo clasifica como punto borde. De lo contrario, pasa a ser un punto ruido. Finalmente, se establecen los sub-conjuntos mixtos de puntos centrales y borde que se hallan a menos de Eps unos de otros. Esto resulta en un cierto número de grupos de puntos contiguos asociados por su cercanía y densidad circundante, y un conjunto accesorio de puntos ruido que se encuentran aislados de estas agrupaciones. Una de las ventajas del algoritmo DBSCAN es que no es necesario establecer de antemano el número exacto de grupos de puntos esperados, además de ser muy robusto respecto de la geometría arbitraria que éstos puedan presentar. En nuestro caso, elegimos el valor estándar de 4 para el parámetro minPts y un valor de 60  $\mu$ m para Eps, seleccionado luego de analizar la distribución del número de agrupaciones versus Eps, siguiendo las recomendaciones en la descripción original del algoritmo. Es importante notar que el valor de Eps supera la distancia rostro-caudal entre cortes para nuestro muestreo, asegurando de esta forma que los grupos de puntos puedan extenderse entre cortes contiguos. Este análisis matemático puso en evidencia que las neuronas eGFP+ del NTS pueden agruparse en dos tipos de grupos: un par de grupos en la parte rostral del núcleo, dispuestos de forma simétrica respecto de la línea media entre los bregmas -6,5 mm y -7,0 mm formado por

~650 neuronas eGFP+, y un grupo en la parte caudal del NTS situado sobre la línea media, entre los bregmas -7,1 mm y -7,7 mm formado por ~750 neuronas eGFP+ (Figura 3). El resto de las neuronas eGFP+ del NTS se clasificaron como no agrupadas (~300 neuronas eGFP+) o formando pequeños grupos de menos de 20 células (~130 neuronas eGFP+).

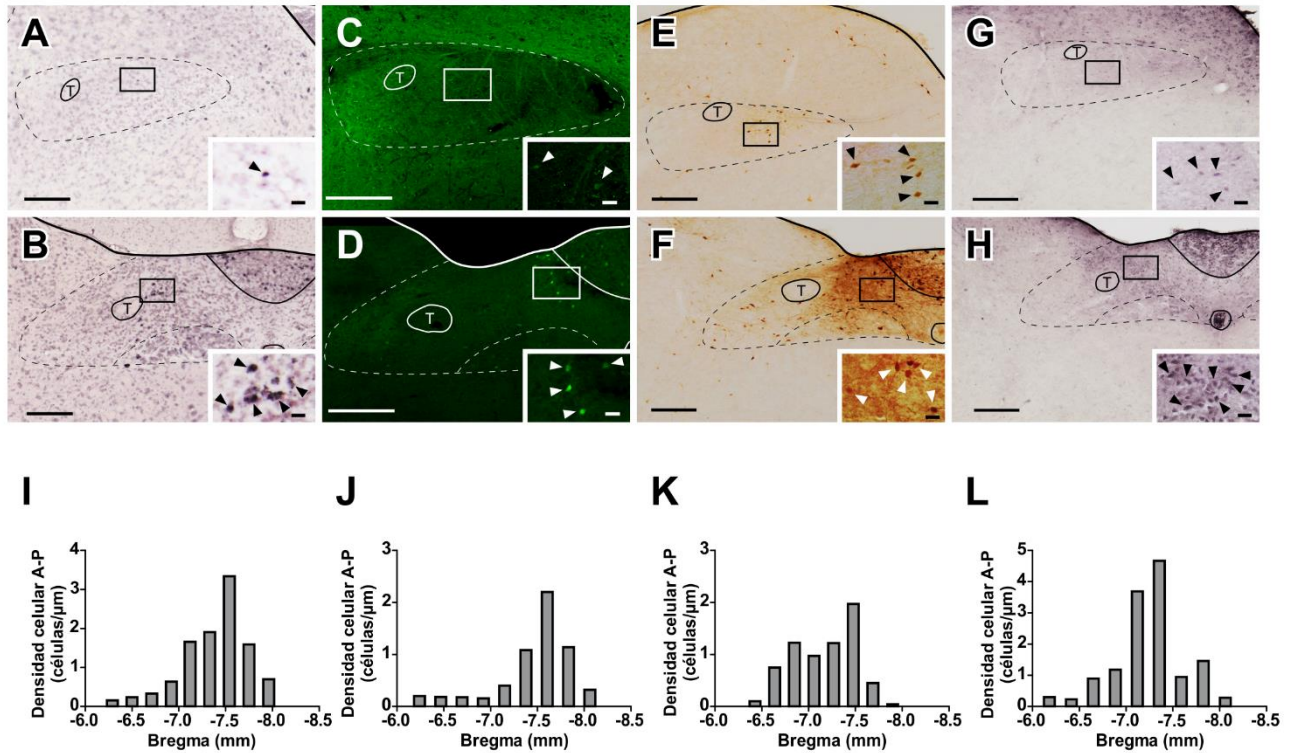


**Figura 3. Las neuronas eGFP+ del NTS se distribuyen en grupos distintos.** El Panel A de la imagen muestra una proyección dorsal de todas las neuronas eGFP+ (representadas como círculos) encontradas en 55 secciones seriales de un ratón  $Ghsr^{eGFP}$  junto con una proyección de los límites del NTS como referencia. Las neuronas se codificaron con distintos colores de acuerdo al grupo al que pertenecen: en magenta se encuentran las neuronas del grupo rostral y en cyan, las del grupo posterior. Las coordenadas antero-posteriores según bregma se muestran a la izquierda en mm. El Panel B muestra diferentes representaciones de volúmenes 3D del arreglo de las neuronas eGFP+ en el volumen del NTS. De izquierda a derecha: fila superior, vistas lateral (izquierda) y ortogonal caudal (derecha); fila inferior, vistas inclinadas dorsal (izquierda) y ventral (derecha). Las neuronas eGFP+ se representaron como esferas con el mismo código de color empleado en A. Los límites del NTS (gris claro) y del AP (verde) se muestran en todas las vistas. Los insertos muestran una imagen más amplia de cada representación 3D, con el delineado de la médula (naranja) incluido. A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral; L, izquierda; R, derecha.

Siguiendo con el NTS, también se realizó un análisis neuroanatómico detallado de distintas técnicas que permiten la visualización de las células que expresan el GHSR. Las herramientas que se analizaron fueron: a)

la ISHH en animales WT utilizando el set de imágenes del *Allen Mouse Brain Atlas* (Figura 4A-B), b) la detección directa de la fluorescencia de eGFP en ratones  $Ghsr^{eGFP}$  (Figura 4C-D), c) la inmuno-tinción cromogénica anti-eGFP en ratones  $Ghsr^{eGFP}$  (Figura 4E-F) y d) el pegado de F-ghrelina en ratones WT administrados por vía ICV con F-ghrelina (Figura 4G-H). Los cuatro sets de datos mostraron la presencia de células que expresan el GHSR en el NTS. El análisis de las imágenes del *Allen Mouse Brain Atlas* indicó que el NTS contiene ~2100 células que expresan el GHSR y que el ~87% de las mismas se encuentran concentradas entre los bregmas -7,0 mm y -8,0 mm (Figura 4I). Una particularidad del análisis fue que el conteo manual realizado a partir del set de imágenes del *Allen Mouse Brain Atlas* sobre a la expresión del GHSR arrojó un número mayor de células que expresan el GHSR comparado con el análisis automatizado que ofrece la base de datos, indicando cierto grado de subestimación en las cuantificaciones automatizadas. El análisis de las células fluorescentes en las secciones de cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  mostró que el NTS presenta ~1400 células eGFP+, de las cuales el ~86% se encuentran localizadas entre los bregmas -7,0 mm y -8,0 mm (Figura 4J). El análisis de la inmuno-tinción anti-eGFP en las secciones de cerebro de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  indicó que el NTS contiene ~1800 células que expresan el GHSR y que el ~60% de las mismas se sitúan entre los bregmas -7,0 mm y -8,0 mm (Figura 4K). Finalmente, el análisis de la distribución de células que unen F-ghrelina de ratones WT muestra que existen ~3300 células fluoresceína+ en el NTS y que el ~80% de las mismas se encuentra entre los bregmas -7,0 mm y -8,0 mm (Figura 4L). Una característica interesante que se observó en el set de muestras de animales inyectados con F-ghrelina fue que las células fluoresceína+ en el NTS rostral mostraron una tinción más débil que las células fluoresceína+ de la parte caudal del NTS. Además, todos los métodos presentaron un buen nivel de congruencia en términos de la distribución coronal de las posibles neuronas que expresan el GHSR del NTS.





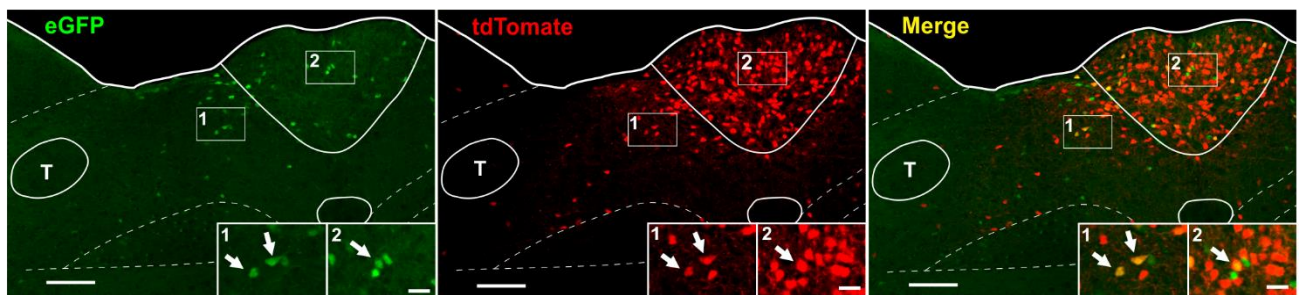
**Figura 4. Las neuronas eGFP+ se distribuyen a lo largo del eje antero-posterior en el NTS.** Los paneles A-H muestran microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratón conteniendo el NTS. La fila superior muestra imágenes de cortes del NTS anterior, mientras que la fila inferior muestra imágenes del NTS posterior. En todos los casos, se superpuso una imagen con la sub-división del complejo dorsal del vago de acuerdo al Atlas del Cerebro de Ratón de Paxinos y Franklin (2001). Los insertos de cada imagen muestran, en alta magnificación, el área marcada con un rectángulo en las imágenes de baja magnificación y las puntas de flecha apuntan a células positivas para cada técnica de tinción. Las imágenes A y B, muestran microfotografías representativas de la ISHH contra GHSR extraída del Allen Mouse Brain Atlas; las imágenes C y D muestran microfotografías representativas de la fluorescencia de eGFP en un corte coronal de un ratón *Ghsr<sup>eGFP</sup>*; las imágenes E y F muestran microfotografías representativas de la inmuno-tinción anti-eGFP en el cerebro de un ratón *Ghsr<sup>eGFP</sup>*; las imágenes G y H muestran microfotografías representativas de la inmuno-tinción anti-fluoresceína en el cerebro de un ratón WT inyectado ICV con F-ghrelina. Barras de escala: 200 μm, baja magnificación y 20 μm, alta magnificación. Los paneles I-L muestran las cuantificaciones en el eje antero-posterior del número de células que expresa GHSR detectada por las distintas técnicas mostradas en los paneles de microfotografías: ISHH anti-GHSR (I), fluorescencia de eGFP en ratones *Ghsr<sup>eGFP</sup>* (J), inmuno-tinción anti-eGFP (K) e inmuno-tinción anti-fluoresceína (L).

## 2. Caracterización del fenotipo neuronal presente en los núcleos cerebrales del complejo dorsal del vago que expresan el GHSR

A continuación, decidimos estudiar el fenotipo de las neuronas que expresan GHSR del AP y del NTS. Para ello, utilizamos ratones *Ghsr<sup>eGFP</sup>* a los que perfundimos y utilizamos las secciones coronales de sus cerebros para realizar inmuno-tinciones fluorescentes contra distintos marcadores de las poblaciones neuronales presentes en ambos núcleos. Así, realizamos inmuno-tinciones contra los neuropéptidos met-enkefalina, NPY y TRH y contra las enzimas TH y ChAT, utilizadas como marcadores de neuronas catecolaminérgicas y colinérgicas, respectivamente. Todas estas poblaciones neuronales se encuentran presentes en el complejo dorsal del vago; sin embargo, no obtuvimos co-localizaciones de la señal inmuno-reactiva para estos marcadores y eGFP (datos no mostrados). Otra población neuronal presente en el complejo dorsal del vago

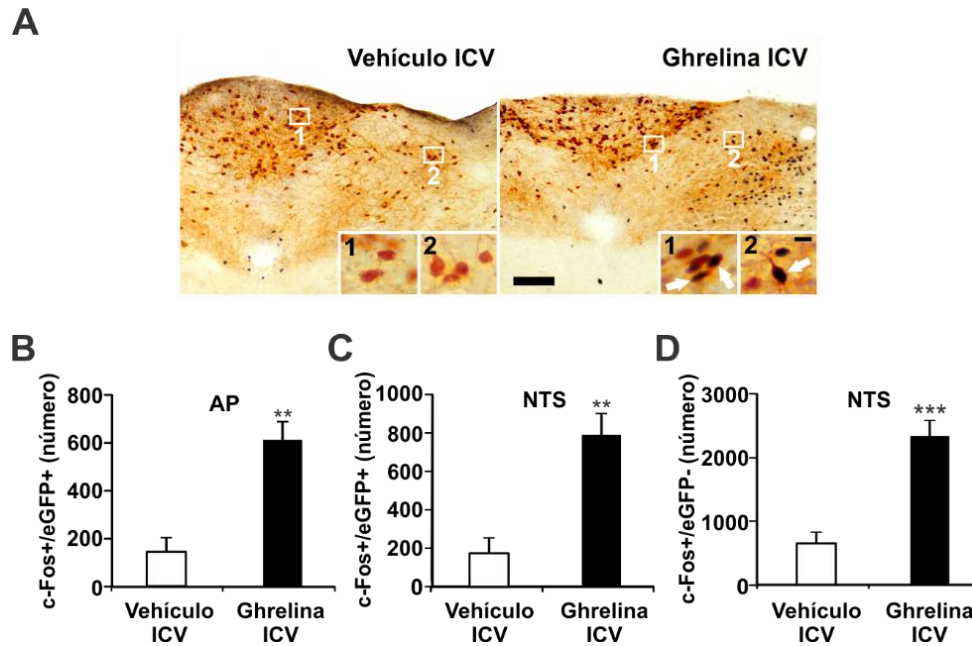


es la de neuronas GABA. Para marcar este tipo de neuronas se pueden utilizar las dos isoformas de la enzima limitante en la producción de GABA, Gad65 y Gad67. Ambas isoformas son producidas por las neuronas en muy bajas cantidades de modo que no se detectan fácilmente a través de inmuno-tinciones, a diferencia de los marcadores mencionados anteriormente. Por esta razón, se generaron ratones que producen eGFP en las neuronas que expresan GHSR y una proteína fluorescente roja, tdTomate, en una sub-población de neuronas GABA que expresan Gad65 (ratones  $Ghsr^{eGFP}-Gad^{cre/+}-Rosa26^{tdTomate}$ ). El análisis cuantitativo del grado de co-localización entre la señal de eGFP y tdTomate indicó que el  $69\pm 8\%$  de las neuronas eGFP+ del AP son también tdTomate+ (Figura 5). En el caso del NTS, en el grupo caudal de neuronas eGFP+ del NTS, el  $30\pm 9\%$  de las neuronas eGFP+ mostró también señal tdTomate+ mientras que, en el grupo rostral de neuronas eGFP+ del NTS, el  $5\pm 1\%$  de las neuronas eGFP+ fue también tdTomate+ (Figura 5).



**Figura 5. Las neuronas eGFP+ del AP y un sub-grupo de neuronas eGFP+ del NTS son neuronas GABA.** El Panel muestra microfotografías representativas de cortes coronales del cerebro de un ratón  $Ghsr^{eGFP}-Gad^{cre/+}-Rosa26^{tdTomate}$ . La imagen de la izquierda muestra la fluorescencia de eGFP, la del medio muestra la fluorescencia de tdTomate y la imagen de la derecha, el merge entre ambas señales. En todos los casos, se superpuso una imagen con la sub-división del complejo dorsal del vago de acuerdo al Atlas del Cerebro de Ratón de Paxinos y Franklin (2001) y los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas marcadas con un rectángulo en la imagen de baja magnificación y las flechas apuntan a las neuronas en que las señales de eGFP y de tdTomate co-localizan. Barras de escala: 200  $\mu m$ , baja magnificación y 20  $\mu m$ , alta magnificación.

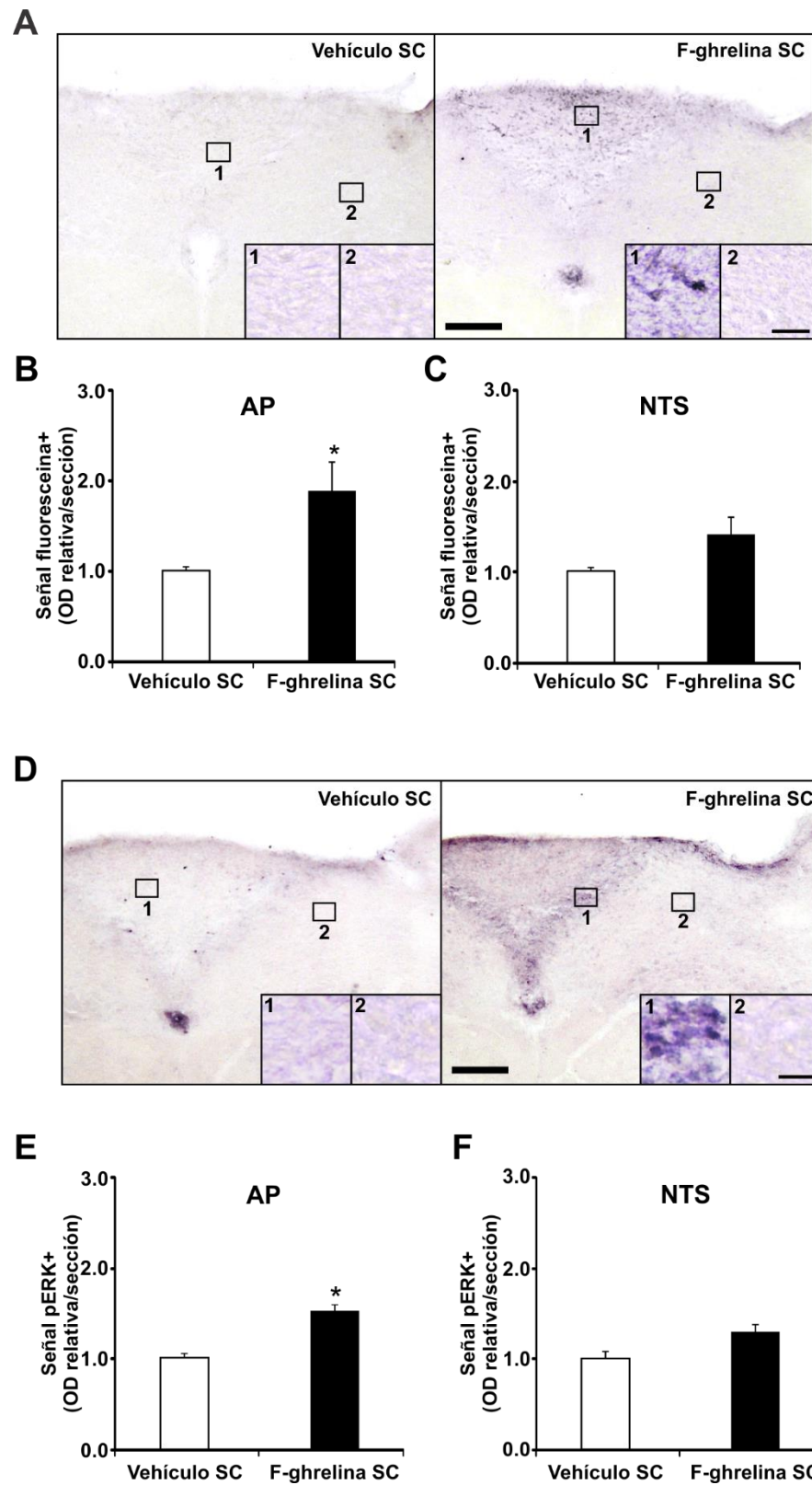
Para corroborar que las neuronas eGFP+ del AP y del NTS son capaces de responder a la ghrelina con un aumento de c-Fos, realizamos administraciones ICV de la hormona a través de cánulas implantadas en el ventrículo lateral de ratones  $Ghsr^{eGFP}$ . Los ratones se perfundieron a las 2 horas pos-inyección, se extrajeron sus cerebros y se cortaron en secciones coronales. Luego, una de las series de secciones coronales se utilizó para realizar una inmuno-tinción doble contra c-Fos y contra eGFP. Al realizar el análisis cuantitativo de las inmuno-tinciones dobles, los animales inyectados ICV con ghrelina mostraron un aumento en el número de neuronas c-Fos+/eGFP+ tanto en el AP como en el NTS, respecto de los ratones inyectados con vehículo (LCRa) (Figura 6A y 6B). Al mismo tiempo, los ratones tratados ICV con ghrelina presentaron un aumento en el número de neuronas c-Fos+/eGFP- en el NTS, respecto de animales inyectados ICV con LCRa (Figura 6C).



**Figura 6. Las neuronas eGFP+ del AP y del NTS responden a la administración central de ghrelina.** El Panel A muestra microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> sometidos a una inmuno-tinción doble contra c-Fos y contra eGFP. La imagen de la izquierda muestra una inmuno-tinción en un animal inyectado con vehículo (LCRa) por vía ICV, mientras que la imagen de la derecha muestra una inmuno-tinción en un animal inyectado con ghrelina. En ambos casos, los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por los rectángulos de las imágenes de baja magnificación. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación. Los Paneles B y C muestran el análisis cuantitativo del número de neuronas c-Fos+/eGFP+ en el AP (B) y en el NTS (C) de ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> tratados por vía ICV con LCra o con ghrelina. El Panel D muestra el análisis cuantitativo del número de neuronas c-Fos+/eGFP- en el NTS de ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> tratados por vía ICV con LCra o con ghrelina. \*\*, p<0,01 vs vehículo ICV, test t de Mann Withney (AP) o de Student (NTS).

### 3. Estudio de la respuesta de las neuronas del complejo dorsal del vago a aumentos en la concentración plasmática de ghrelina

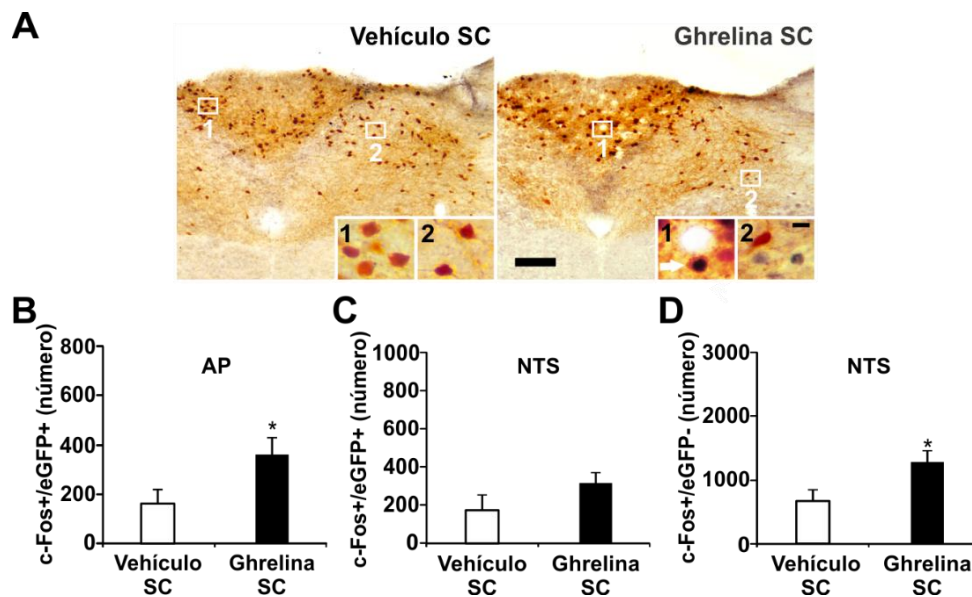
Para evaluar el acceso de la ghrelina al AP y al NTS, se inyectaron ratones WT con el trazador F-ghrelina. Los animales se inyectaron por vía subcutánea con F-ghrelina, se perfundieron, se extrajeron sus cerebros y se utilizó una de las series de secciones coronales para realizar una inmuno-tinción contra fluoresceína (Figura 7A) y otra serie para realizar una inmuno-tinción contra pERK (Figura 7D), utilizado como marcador de la acción directa de la ghrelina sobre las neuronas. Los ratones administrados de forma subcutánea con F-ghrelina mostraron un aumento en la intensidad de la señal fluoresceína+ sólo en el AP (Figura 7B y 7C). En el caso de la inmuno-tinción contra pERK, nuevamente los animales tratados con el trazador fluorescente mostraron un aumento en la intensidad de la señal p-ERK+ sólo en el AP, y no en el NTS (Figura 7E y 7F). Ambos resultados indicaron que la ghrelina administrada periféricamente impacta únicamente en el AP, mientras que la hormona no sería capaz de alcanzar el NTS.



**Figura 7. La ghrelin administrada periféricamente impacta únicamente en el AP.** Los Paneles A y D muestran microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones WT inyectados por vía subcutánea con salina o con F-ghrelin sometidos a una inmuno-tinción anti-fluoresceína (A) y anti-pERK (D). Los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas correspondientes

delimitadas en las imágenes de baja magnificación. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación. Los **Paneles B-C** y **E-F** muestran el análisis cuantitativo de la intensidad de señal de las inmuno-tinciones anti-fluoresceína en el AP (**B**) y en el NTS (**C**) y de la inmuno-tinción anti-pERK en el AP (**E**) y en el NTS (**F**). \*,  $p < 0,05$  vs vehículo, test t de Student.

A continuación, evaluamos la respuesta de las neuronas eGFP+ del AP y del NTS a la administración periférica de ghrelina. Para ello, se inyectaron ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> con salina o ghrelina de forma subcutánea y dos horas después se perfundieron y una de las series de secciones coronales se utilizó para realizar una inmuno-tinción cromogénica doble contra eGFP y contra c-Fos. Al realizar el análisis cuantitativo de las muestras en el AP y en el NTS, los animales inyectados con ghrelina, respecto de los inyectados con salina, presentaron un aumento en el número de neuronas c-Fos+/eGFP+ en el AP y no así en el NTS (Figura 8A a 8C). Los ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> inyectados con ghrelina presentaron, a su vez, un aumento en el número de neuronas c-Fos+/eGFP- en el NTS que no se observó en el AP (Figura 8D).

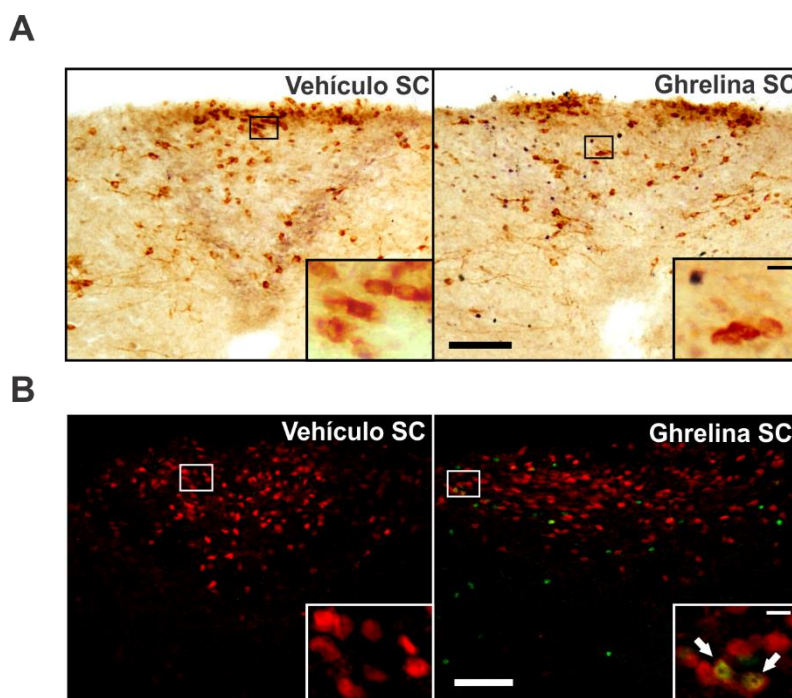


**Figura 8. Las neuronas eGFP+ del AP responden a la administración periférica de ghrelina.** El **Panel A** muestra microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> sometidos a una inmuno-tinción doble contra c-Fos y contra eGFP. La imagen de la izquierda muestra una inmuno-tinción en un animal inyectado con vehículo (salina) por vía SC, mientras que la imagen de la derecha muestra una inmuno-tinción en un animal inyectado con ghrelina. En ambos casos, los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por los rectángulos en las imágenes de baja magnificación y la flecha apunta a una neurona c-Fos+/eGFP+. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación. Los **Paneles B** y **C** muestran el análisis cuantitativo del número de neuronas c-Fos+/eGFP+ en el AP (**B**) y en el NTS (**C**) de ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> tratados por vía SC con salina o con ghrelina. El **Panel D** muestra el análisis cuantitativo del número de neuronas para c-Fos+ en el NTS de ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> tratados por vía SC con salina o con ghrelina. \*,  $p < 0,05$  vs vehículo SC, test t de Student.

Para determinar si la activación observada en las células eGFP+ del AP se correspondía con el fenotipo antes descrito para las neuronas que expresan GHSR del AP, realizamos inyecciones subcutáneas de la hormona y evaluamos el perfil de c-Fos en las neuronas catecolaminérgicas y en las neuronas GABA del AP. Para corroborar que las neuronas que responden a ghrelina no fueran catecolaminérgicas, se empleó una de las series de cortes de los ratones Ghnr<sup>eGFP</sup> inyectados con ghrelina por vía subcutánea para realizar una inmuno-tinción doble contra c-Fos y contra TH (Figura 9A). Los ratones inyectados con ghrelina no mostraron células



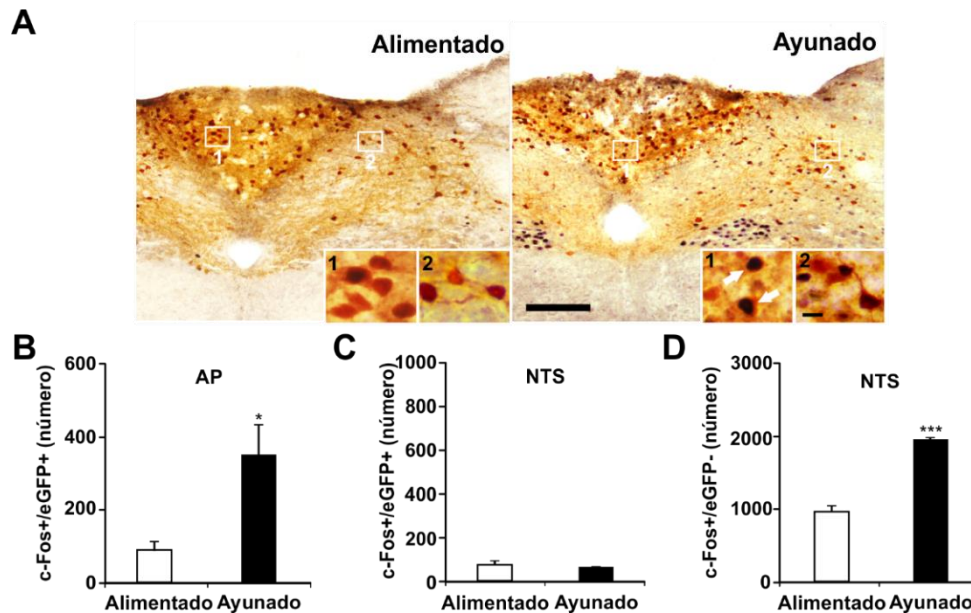
c-Fos+/TH+ en el AP. Al mismo tiempo, se inyectaron ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomato}$  con ghrelina por vía subcutánea y una de las series de sus cerebros se utilizó para realizar una inmuno-tinción fluorescente contra c-Fos (Figura 9B). En este caso, los ratones inyectados con ghrelina mostraron un aumento en el porcentaje de células c-Fos+/tdTomato+ respecto del total de células tdTomato+ del AP ( $9\pm2\%$  ghrelina SC vs  $0\pm0\%$  salina SC).



**Figura 9. Las neuronas del AP que responden a la administración periférica de ghrelina son GABAérgicas.** El **Panel A** muestra microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  sometidos a una inmuno-tinción doble contra c-Fos y contra TH. La imagen de la izquierda muestra una inmuno-tinción en el cerebro de un animal inyectado con vehículo (salina) por vía SC, mientras que la imagen de la derecha muestra una inmuno-tinción en el cerebro de un animal inyectado con ghrelina. En ambos casos, los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por los rectángulos en las imágenes de baja magnificación. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación. El **Panel B** muestra microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomato}$  sometidos a una inmuno-tinción fluorescente contra c-Fos. La imagen de la izquierda muestra una inmuno-tinción en un animal inyectado con salina por vía SC, mientras que la imagen de la derecha muestra una inmuno-tinción en el cerebro de un animal inyectado con ghrelina. Los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas marcadas en los rectángulos en las imágenes de baja magnificación y las flechas apuntan a co-localizaciones. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación.

Para estudiar si las neuronas que expresan GHSR del AP y del NTS son sensibles a aumentos endógenos de ghrelina, ayunamos ratones  $Ghsr^{eGFP}$  por 48 horas y luego los sacrificamos, extrajimos sus cerebros y realizamos inmuno-tinciones cromogénicas dobles contra c-Fos y contra eGFP. Los animales ayunados por 48 horas presentaron un estado de salud general bueno, sin signos de deshidratación, a pesar de perder  $\sim 19\%$  de su peso y  $\sim 65\%$  de su grasa corporal. Los niveles de ghrelina plasmática medidos en los animales ayunados fue de  $701\pm 121$  pg/mL, lo cual representa aproximadamente el doble del valor que presentaron los animales alimentados *ad libitum*, que fue de  $382\pm 43$  pg/mL. El análisis cuantitativo de las secciones de cerebro sometidas a la inmuno-tinción doble contra c-Fos y contra eGFP mostró un aumento en el número de neuronas

c-Fos+/eGFP+ en el AP de los animales ayunados por 48 horas respecto de los animales alimentados *ad libitum* (Figura 10A y 10B). El NTS de los animales ayunados por 48 horas no presentó cambios en el número de neuronas c-Fos+/eGFP+, aunque nuevamente se observó un aumento en el número de neuronas c-Fos+/eGFP- respecto de animales alimentados (Figura 10C y 10D). Dado que el ayuno puede afectar la homeostasis de fluidos corporal, comparamos la inducción de c-Fos en el AP de ratones WT de un experimento independiente en el que los animales recibieron, o no, fluidoterapia durante las 48 horas de ayuno. Los animales ayunados y tratados con salina no presentaron cambios significativos en el número de neuronas c-Fos+ en el AP comparados con los animales ayunados que no recibieron fluidoterapia ( $524 \pm 94$  vs  $464 \pm 108$  células c-Fos+, respectivamente).

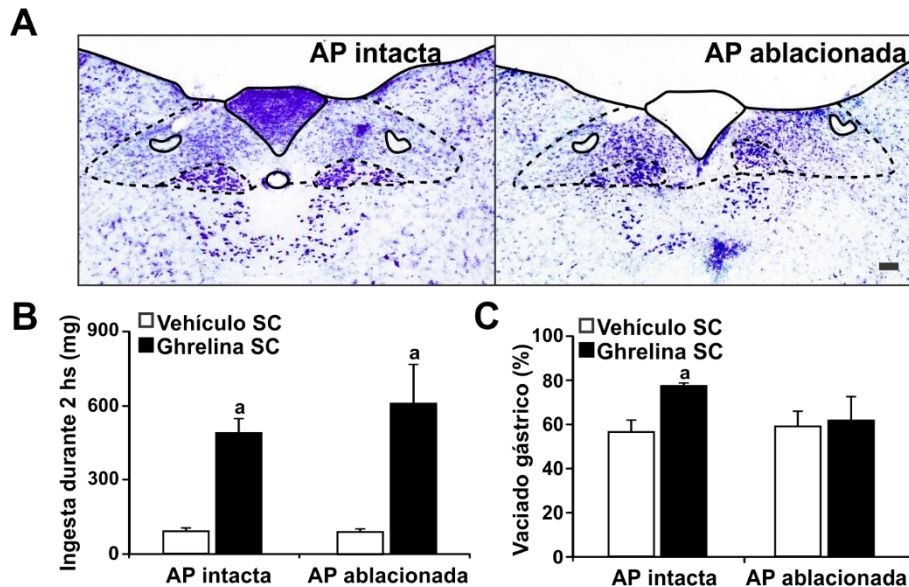


**Figura 10. Las neuronas eGFP+ del AP responden a aumentos endógenos en los niveles plasmáticos de ghrelina.** El **Panel A** muestra microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones Ghre<sup>eGFP</sup> sometidos a una inmunotinción doble contra c-Fos y contra eGFP. La imagen de la izquierda muestra una inmunotinción en un animal alimentado, mientras que la imagen de la derecha muestra una inmunotinción en un animal ayunado por 48 horas. En ambos casos, los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por los rectángulos en las imágenes de baja magnificación y la flecha apunta a célula c-Fos+/eGFP+. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación. Los **Paneles B** y **C** muestran el análisis cuantitativo del número de neuronas c-Fos+/eGFP+ en el AP (**B**) y en el NTS (**C**) de ratones Ghre<sup>eGFP</sup> alimentados *ad libitum* o ayunados por 48 horas. El **Panel D** muestra el análisis cuantitativo del número de neuronas c-Fos+/eGFP- en el NTS de ratones Ghre<sup>eGFP</sup> alimentados *ad libitum* o ayunados por 48 horas. \*,  $p < 0,05$  vs y \*\*,  $p < 0,01$  vs alimentado, test t de Student (AP) y test de Mann-Withney (NTS).

## 4. Estudio de las funciones moduladas por el sistema de ghrelina y GHSR a través del complejo dorsal del vago

Más adelante, estudiamos el posible rol que desempeñan las neuronas que expresan el GHSR del AP y del NTS. Con respecto al AP, se sabe que es una estructura que media el efecto de algunas hormonas, como la amilina, sobre el vaciado gástrico (Young, 2005). A su vez, también se conoce que la ghrelina induce el vaciado

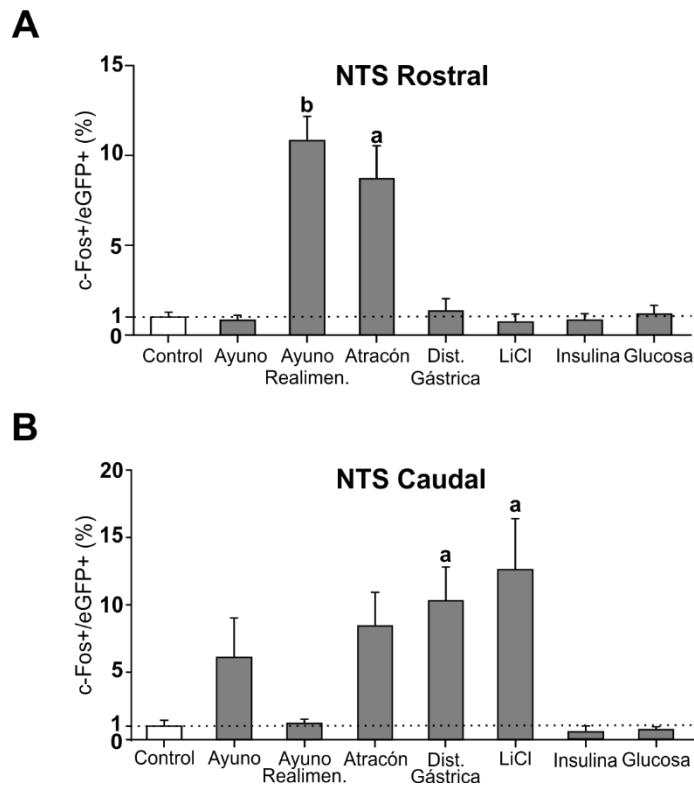
gástrico en ratones (Dornonville de la Cour et al., 2004). Así, decidimos estudiar el rol del AP en el vaciado gástrico inducido por ghrelina. Para ello, se utilizaron ratones WT con el AP intacta o con el AP ablacionada generados mediante una cirugía que incluye la aspiración del AP (Figura 11A). En primer lugar, se corroboró que los animales con el AP ablacionada mantuvieran intacto el consumo de dieta estándar inducido por ghrelina. Se inyectaron animales con el AP intacta y con el AP ablacionada por vía subcutánea con ghrelina y, tanto los animales con el AP intacta, como los animales con el AP ablacionada aumentaron el consumo de dieta estándar en respuesta a ghrelina, respecto de sus propios valores en respuesta a la administración subcutánea de salina (Figura 11B). No se observaron diferencias significativas entre los valores de consumo de los animales con el AP intacta respecto de los animales con el AP ablacionada (Figura 11B). A continuación, se evaluó la capacidad de la ghrelina de inducir el vaciado gástrico en los animales antes mencionados. Para cuantificar el grado de vaciado gástrico se utilizó el método del rojo fenol, que consiste en la administración intra-gástrica de una solución de rojo fenol de concentración conocida y se mide la recuperación del colorante por cuantificación de la absorbancia del contenido gástrico con espectrofotómetro y el avance del colorante en el intestino. La administración de ghrelina por vía subcutánea provocó un aumento en el porcentaje de vaciado gástrico de los ratones con el AP intacta respecto de los animales administrados con salina (Figura 11C). En el caso de los animales con el AP ablacionada, la administración subcutánea de ghrelina no produjo diferencias significativas en el porcentaje de vaciado gástrico entre los animales inyectados con ghrelina respecto de los tratados con salina, demostrando la necesidad de la presencia de un AP intacta para que la ghrelina sea capaz de ejercer su efecto en el vaciado gástrico (Figura 11C).



**Figura 11. El aumento en el vaciado gástrico inducido por ghrelina requiere la presencia del AP.** El Panel A muestra microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones WT sometidos a una tinción de Nissl. La imagen de la izquierda muestra un corte coronal de un animal con el AP intacta, mientras que la imagen de la derecha muestra un corte coronal de un animal con el AP ablacionada. En ambos casos, un esquema con los límites de los núcleos del complejo dorsal del vago según el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001) se superpuso a la imagen. Los Paneles B y C muestran el análisis cuantitativo de la ingesta de dieta estándar (B) y del vaciado gástrico (C) en respuesta a la administración SC de salina o ghrelina en animales con el AP intacta o ablacionada. a,  $p < 0,05$  vs vehículo en iguales condiciones de ablación, ANOVA de dos vías seguido por un pos-test de Bonferroni.

Como ya se mencionó en la Introducción, las neuronas que conforman el NTS se pueden dividir en dos grandes grupos: un grupo rostral y un grupo caudal. Además, nuestros resultados del análisis de agrupamiento indicaron que las neuronas eGFP+ del NTS se agrupan en tres grupos distintos de neuronas, dos grupos localizados en la parte rostral y uno localizado en la parte caudal. Así, para estudiar el posible rol que cumplen las neuronas que expresan GHSR del NTS, realizamos una serie de procedimientos experimentales en cuya regulación se sabe que están involucrados el NTS y la ghrelina y analizamos la inducción de c-Fos en los distintos grupos de neuronas eGFP+ del NTS. Se emplearon animales  $Ghsr^{eGFP}$  a los que se expuso a las distintas maniobras experimentales y luego se sometió a las secciones coronales de cerebro obtenidas de estos animales a una inmuno-tinción cromogénica doble contra c-Fos y contra eGFP. En primer lugar, estudiamos la respuesta de los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  a la realimentación luego de un período de ayuno. Este protocolo fue elegido ya que se ha demostrado que una población de neuronas del NTS son reclutadas durante estas circunstancias (Wu et al., 2012). Durante las 48 horas de ayuno, los animales perdieron un  $18,2 \pm 1,3\%$  de su peso corporal, mientras que, durante las 2 horas de realimentación, los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  ingirieron  $915 \pm 125$  mg de dieta estándar y obtuvimos un aumento en el número de neuronas c-Fos+ tanto en la parte rostral del NTS ( $118 \pm 20$  vs  $16 \pm 4$  células/sección) como en la parte caudal del NTS ( $146 \pm 27$  vs  $49 \pm 14$  células/sección) de los animales realimentados, respecto de los animales ayunados por 48 horas. Al mismo tiempo, el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ aumentó en la parte rostral del NTS de los animales realimentados respecto de los ratones ayunados, mientras que el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ del grupo caudal no presentó diferencias significativas comparado con los valores hallados en los animales ayunados (Figura 12A y 12B). Luego, se utilizó un set de animales  $Ghsr^{eGFP}$  independiente para exponerlos a un protocolo de atracón por exposición limitada e intermitente a dieta de alto contenido graso (DACG). Durante este procedimiento experimental, los ratones alimentados *ad libitum* son expuestos por 2 horas a un pellet de DACG durante 4 días consecutivos. Tanto el peso corporal como el consumo de dieta estándar a lo largo del protocolo no variaron significativamente. Los animales expuestos a DACG consumieron  $8,58 \pm 0,27$  kcal/día;  $8,54 \pm 0,59$  kcal/día y  $8,93 \pm 0,63$  kcal/día de dieta estándar y su peso corporal fue  $24,0 \pm 0,4$  g;  $24,2 \pm 0,5$  g y  $24,7 \pm 0,4$  g luego del primer, segundo y tercer día del protocolo, respectivamente. Los ratones expuestos a DACG consumieron  $625 \pm 75$  mg de DACG durante el último evento de ingesta de DACG y mostraron un aumento en el número de neuronas c-Fos+ tanto en la parte rostral ( $68 \pm 10$  vs  $30 \pm 6$  células/sección) como en la parte caudal ( $64 \pm 13$  vs  $27 \pm 9$  células/sección) del NTS, respecto de ratones que no se expusieron a DACG. Al mismo tiempo, los ratones que consumieron DACG durante 2 horas y 4 días consecutivos presentaron un aumento en el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ en la parte rostral del NTS respecto del grupo de animales control, mientras que en el grupo caudal de neuronas eGFP+ del NTS, el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ mostró una tendencia a aumentar que no alcanzó a ser significativa ( $p=0,2478$ ; Figura 12A y 12B).





**Figura 12. Las neuronas eGFP+ del NTS responden a distintos tipos de estímulos de acuerdo al grupo del que forman parte.** Los Paneles A y B muestran el análisis cuantitativo del porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ respecto del total de neuronas eGFP+ y normalizados por el porcentaje obtenido en los animales control. Los ratones Ghsr<sup>eGFP</sup> fueron sometidos a los siguientes protocolos experimentales: ayuno de 48 horas, ayuno de 48 horas seguido de 2 horas de realimentación, atracón por exposición limitada e intermitente a DACG, distensión gástrica, malestar inducido por administración IP de LiCl, hipoglucemia inducida por administración IP de insulina e hiperglucemia inducida por administración IP de glucosa. El Panel A muestra el análisis cuantitativo realizado para el caso de las neuronas eGFP+ que forman parte de los grupos de neuronas eGFP+ rostrales del NTS, mientras que el Panel B muestra el análisis cuantitativo realizado para el caso de las neuronas eGFP+ que forman parte del grupo caudal de neuronas eGFP+ del NTS. a, p<0,05 vs grupo control y b, p<0,05 vs grupo ayuno. Test de ANOVA seguido por un pos-test de Bonferroni.

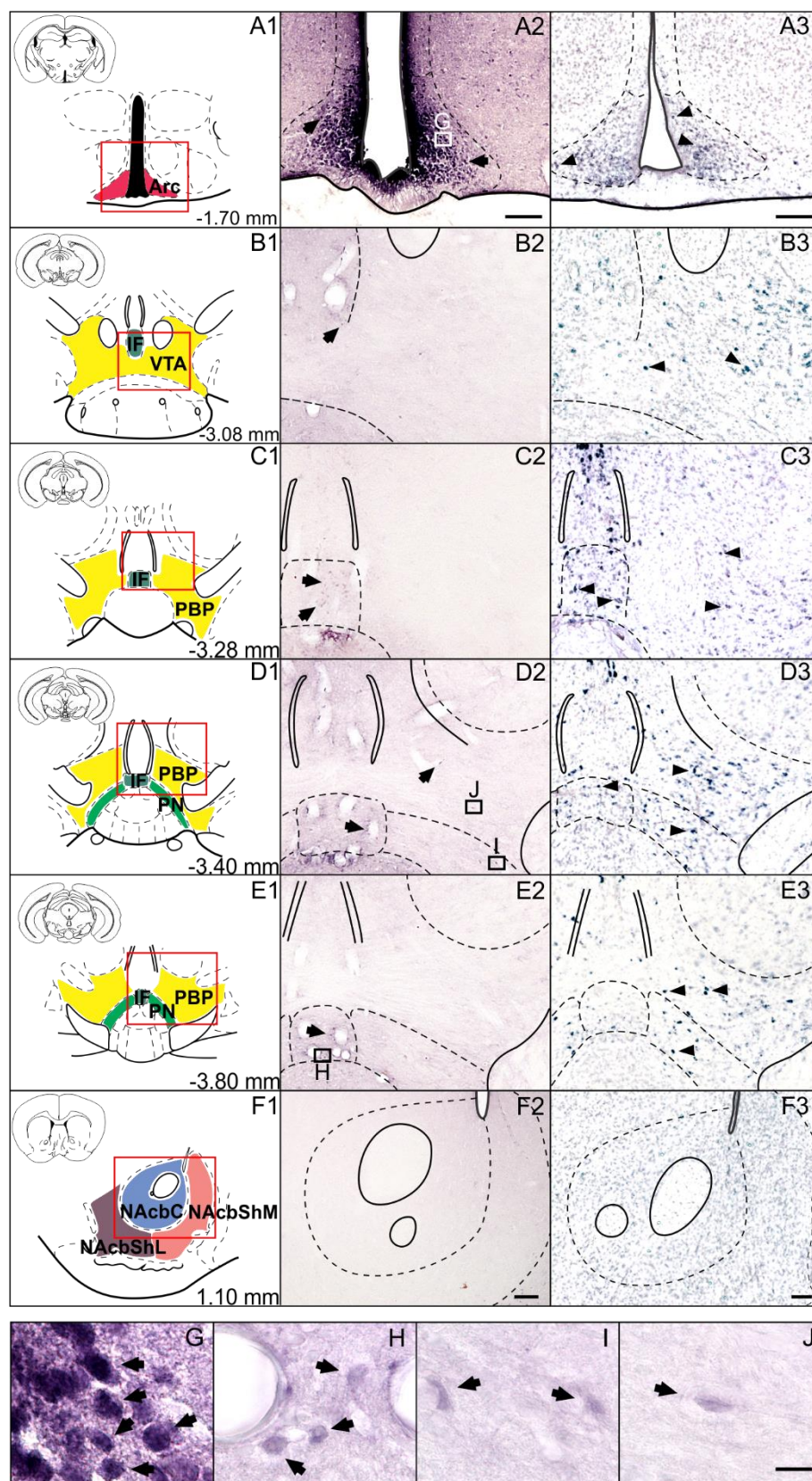
A continuación, realizamos una serie de protocolos relacionados con el control del sistema nervioso autónomo que ejerce el NTS y estudiamos la respuesta de las neuronas eGFP+. Se sabe que un grupo de neuronas del NTS están reguladas por información proveniente del tracto gastrointestinal. Así, se estudió la inducción de c-Fos en las neuronas eGFP+ luego de exponer a los animales Ghsr<sup>eGFP</sup> a un protocolo de distensión gástrica por administración intra-gástrica de vaselina líquida. Los ratones que se expusieron a dicho protocolo mostraron un aumento en el número de neuronas c-Fos+ tanto en la parte rostral ( $110 \pm 22$  vs  $29 \pm 6$  células/sección) como en la porción caudal ( $179 \pm 26$  vs  $30 \pm 10$  células/sección) del NTS, respecto del grupo de animales control. El porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ en el grupo de neuronas eGFP+ caudal del NTS de los ratones Ghsr<sup>eGFP</sup> expuestos al protocolo de distensión gástrica aumentó respecto de los animales control, mientras que el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ no mostró diferencias significativas entre ambos grupos en el grupo de neuronas eGFP+ rostral (Figura 12A y 12B). Por otro lado, se sabe que la sensación de malestar gastrointestinal también activa a las neuronas del NTS. De tal manera, se inyectaron ratones Ghsr<sup>eGFP</sup> por vía intraperitoneal con LiCl, de acuerdo a un protocolo de malestar gastrointestinal previamente caracterizado (De Francesco et al., 2015). Comparado con el grupo control, el número de neuronas c-Fos+ mostró un aumento

únicamente en la porción caudal del NTS ( $96 \pm 23$  vs  $26 \pm 8$  células/sección) de los animales inyectados con LiCl, mientras que el número de neuronas c-Fos+ no se vio afectado en la porción rostral del NTS ( $32 \pm 10$  vs  $29 \pm 6$  células/sección). De igual modo, el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ presentó un aumento en el grupo de neuronas eGFP+ caudal del NTS respecto del grupo control, mientras que el grupo de neuronas eGFP+ rostral no mostró diferencias significativas (Figura 12A y 12B). De acuerdo a la bibliografía, un grupo de neuronas del NTS es capaz de responder a cambios en la glucemia. Así, se estudió la inducción de c-Fos en las neuronas eGFP+ del NTS de animales Ghsc<sup>eGFP</sup> expuestos a protocolos hipo- e hiperglucemiantes. Se inyectó a los ratones con insulina y, luego de 30 minutos, los animales mostraron un descenso de ~75% en los niveles de glucemia. Estos animales no mostraron diferencias en el número de neuronas c-Fos+ ni en la parte rostral ( $25 \pm 5$  vs  $27 \pm 5$  células/sección) ni en la parte caudal ( $48 \pm 11$  vs  $28 \pm 10$  células/sección) del NTS, comparados con animales control. De modo similar, el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ de los animales inyectados con insulina no mostró cambios respecto de los animales control (Figura 12A y 12B). Por otra parte, se inyectó a otro set de animales Ghsc<sup>eGFP</sup> por vía intraperitoneal con una solución de glucosa al 50%, logrando un aumento de ~5 veces en los niveles de glucosa en sangre. En este caso, ni el número de neuronas c-Fos+ en la parte rostral ( $34 \pm 11$  vs  $16 \pm 3$  células/sección) ni en la parte caudal del NTS ( $61 \pm 16$  vs  $49 \pm 14$  células/sección) ni el porcentaje de neuronas c-Fos+/eGFP+ (Figura 12A y 12B) se vieron afectadas en los animales inyectados con glucosa respecto de los animales control.

## Estudio de las poblaciones neuronales del circuito mesolímbico que son reguladas por el sistema de ghrelina y GHSR

### 1. Estudio de la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan el GHSR y son blanco de la ghrelina plasmática en el circuito mesolímbico

Para abordar el estudio del sistema de ghrelina y GHSR en el circuito mesolímbico, lo primero que realizamos fue un análisis detallado de la presencia de neuronas que unen F-ghrelina en los distintos sub-núcleos del AVT y del NAc. En este caso, no empleamos a los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  como modelo experimental, ya que tanto en estudios previos como en los análisis que realizamos en nuestro laboratorio se evidencia el bajo nivel de expresión de eGFP y de congruencia entre la expresión de eGFP y la del ARNm del GHSR en el AVT de estos animales (Mani et al., 2014). Así, para poner en evidencia la presencia del GHSR en el circuito mesolímbico, utilizamos la F-ghrelina para detectar las neuronas a las que se une el trazador. Inyectamos ratones WT con F-ghrelina por vía ICV y 30 minutos después los ratones se perfundieron y sus cerebros se extrajeron, cortaron y se observaron al microscopio de fluorescencia. El análisis neuroanatómico del marcado con F-ghrelina se realizó en el AVT y el NAc, al mismo tiempo que en el ARC, en donde GHSR es altamente expresado y representa un control positivo interno del ensayo. La examinación de los cortes de cerebro de los ratones inyectados con F-ghrelina al microscopio de fluorescencia reveló la presencia de células claramente marcadas principalmente en el ARC, como se ha reportado previamente (Cabral et al., 2013). Con el objetivo de mejorar la visualización del marcado por F-ghrelina en el AVT, se realizó una inmuno-tinción cromogénica contra fluoresceína que provee una sensibilidad mayor gracias al paso de amplificación enzimática de la reacción. Bajo estas condiciones, se encontraron cuerpos celulares fluoresceína+ en el ARC y en el AVT, mientras que no se observó señal en el NAc (Figura 13, columna 2). El número de células fluoresceína+ en el ARC se estimó en ~1650 y fueron relativamente homogéneas en forma, de tamaño pequeño (~7  $\mu m$ ), con una tinción oscura y enriquecidas en el ARC ventromedial (Figura 13 A2 y G). Se detectaron células fluoresceína+ en el AVT de 5 de los 7 ratones tratados con F-ghrelina. Como esperábamos de acuerdo a lo observado mediante fluorescencia, la intensidad de señal de las células fluoresceína+ fue más débil en el AVT comparada con la señal de las células fluoresceína+ del ARC (Figura 13 G-J). El número de neuronas fluoresceína+ en el AVT se estimó en ~520 y se encontraron enriquecidas en el IF (~70%) pero también presentes en el PBP (~20%) y en el PN (~10%). No se observaron células fluoresceína+ en el CLi y en el RLi. Llamativamente, las células fluoresceína+ de cada sub-núcleo del AVT mostraron diferencias citoarquitectónicas. Las células fluoresceína+ del IF eran homogéneas, de forma redondeada, de tamaño pequeño (~9  $\mu m$ ) y agrupadas densamente (Figura 13 H). Las células fluoresceína+ en el PBP y el PN fueron más heterogéneas en tamaño (variando entre 7 y 12  $\mu m$ ), de forma ahusada y sin una orientación uniforme (Figura 13 I-J). De modo similar a lo indicado para el análisis del pegado de F-ghrelina, el análisis de la ISHH reportada por el *Allen Mouse Brain Atlas* (Lein et al., 2007) reveló que las neuronas que expresan GHSR están enriquecidas en el ARC, presentes en el RLi, el IF, el PN y el PBP y ausentes en el NAc (Figura 13, columna 3).



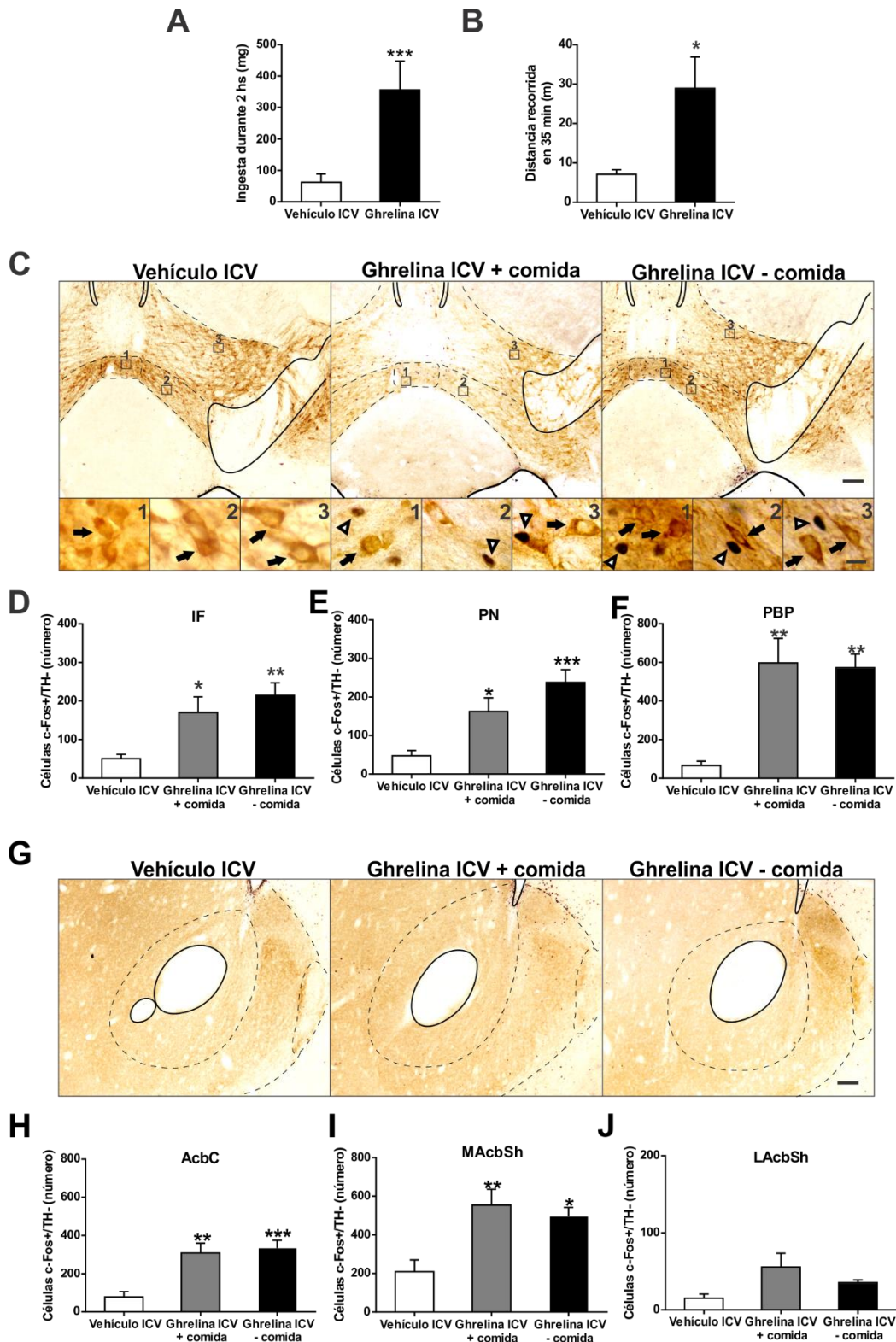
**Figura 13. Las neuronas que expresan GHSR se encuentran en los sub-núcleos del AVT.** Los **Paneles A1-F1** muestran esquemas extraídos del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001) con los distintos núcleos y sub-núcleos coloreados. La coordenada antero-posterior está indicada en mm respecto de Bregma y el rectángulo rojo en cada imagen delimita el área mostrada en las imágenes de las columnas 2 y 3. Los **Paneles A2-F2** muestran microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones WT inyectados por vía ICV con F-ghrelina. Las imágenes muestran los cortes coronales sometidos a una inmuno-tinción anti-fluoresceína. En todos los casos, un esquema extraído del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001) con las subdivisiones de cada núcleo se superpuso a la imagen y las flechas apuntan a neuronas fluoresceína+. Los **Paneles A3-F3** muestran microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones WT sometidos a una ISHH contra GHSR, extraídas del *Allen Mouse Brain Atlas*. En todos los casos, un esquema extraído del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001) con las subdivisiones de cada núcleo se superpuso a la imagen y las flechas apuntan a neuronas con señal positiva para GHSR. Barras de escala: 100  $\mu$ m. Los **Paneles G-J** muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por rectángulos en las imágenes A2, D2 y E2. Las flechas apuntan a células fluoresceína+. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

## **2. Caracterización del fenotipo neuronal presente en los núcleos del circuito mesolímbico que expresan el GHSR**

Para estudiar qué neuronas del circuito mesolímbico responden a la ghrelina, realizamos inyecciones ICV de la hormona con el fin de estudiar qué población neuronal aumenta los niveles de c-Fos. Las administraciones se realizaron a través de cánulas implantadas en el ventrículo lateral y estudiamos la inducción de c-Fos en el AVT y en el NAcb. La administración ICV de ghrelina aumentó el consumo de dieta estándar en ratones alimentados *ad libitum* (Figura 14A) al mismo tiempo que produjo un aumento de ~4 veces en la actividad locomotora de ratones que no tienen acceso a comida (Figura 14B). La actividad locomotora de los ratones se utilizó como evidencia comportamental de la activación del circuito mesolímbico, ya que se ha descrito que el AVT modula la actividad locomotora y que aumentos en la liberación de dopamina en el NAcb llevan a aumentos en la actividad locomotora (Adamantidis et al., 2011; Boekhoudt et al., 2016). Luego de realizar las administraciones ICV, los ratones se perfundieron y se realizaron inmuno-tinciones cromogénicas dobles contra c-Fos y contra TH para estudiar la activación de las neuronas del AVT y del NAcb. Se cuantificaron los niveles de c-Fos en los sub-núcleos del AVT que mostraron la presencia de células fluoresceína+ en el apartado anterior, así como también en el NAcb, principal blanco del AVT. La observación de la señal inmuno-reactiva para TH en el AVT permite no sólo estimar el efecto de la ghrelina sobre las neuronas dopaminérgicas sino también definir mejor los límites de los sub-núcleos del AVT ya que las características citoarquitectónicas de las neuronas dopaminérgicas en cada sub-núcleo son diferentes (Figura 14C). En particular, las neuronas TH+ del PN son homogéneas, de tamaño medio (~10  $\mu$ m) y orientadas de forma semi-lateral. Las células TH+ del PBP son de tamaño grande (~13  $\mu$ m) y sin orientación definida, mientras que las células TH+ del IF son pequeñas (~9  $\mu$ m) y densamente empaquetadas en el volumen del núcleo (Figura 14C). En el NAcb, la distribución de las fibras TH+ ayuda a delinear los límites de las subdivisiones del núcleo (Figura 14D). Como la ingesta *per sé* puede afectar el número de células c-Fos+ en algunas áreas del cerebro, el análisis cuantitativo de las células c-Fos+ se realizó en muestras de ratones inyectados ICV con ghrelina que tuvieron, o no, acceso a dieta estándar. La administración ICV de ghrelina provocó un aumento similar en el número de células c-Fos+ del ARC de los ratones con o sin acceso a comida, respecto del grupo de ratones inyectados con vehículo (datos no mostrados). Comparado con el tratamiento con vehículo (Figura 14C), los ratones tratados por vía ICV con ghrelina que tuvieron o no acceso a comida presentaron aumentos de ~3,5; ~5 y ~9 veces en el número de células c-Fos+/TH- en el IF (Figura 14D), el PN (Figura 14E) y el PBP (Figura 14F),

respectivamente. La administración ICV de ghrelina produjo un aumento de ~6 veces en el número de células c-Fos+/TH+, comparado con el tratamiento con vehículo, exclusivamente en el PBP de los ratones que no tuvieron acceso a dieta estándar ( $32 \pm 7$  vs  $5 \pm 4$  células c-Fos+/TH+, respectivamente,  $p=0,0009$ ); estas células doblemente marcadas representaron el  $5,0 \pm 1,1\%$  del total de células c-Fos+ del PBP. Comparado con el tratamiento con vehículo (Figura 14G), la inyección ICV de ghrelina indujo un aumento de ~4,5 veces el número de células c-Fos+ en el NAcbC (Figura 14H) de los ratones sin acceso a comida, así como un aumento de ~3 veces en el número de células c-Fos+ en el NAcbShM (Figura 14I) y un aumento de ~5 veces en el número de células c-Fos+ en el NAcbShL (Figura 14J) de los ratones con o sin acceso a dieta estándar.



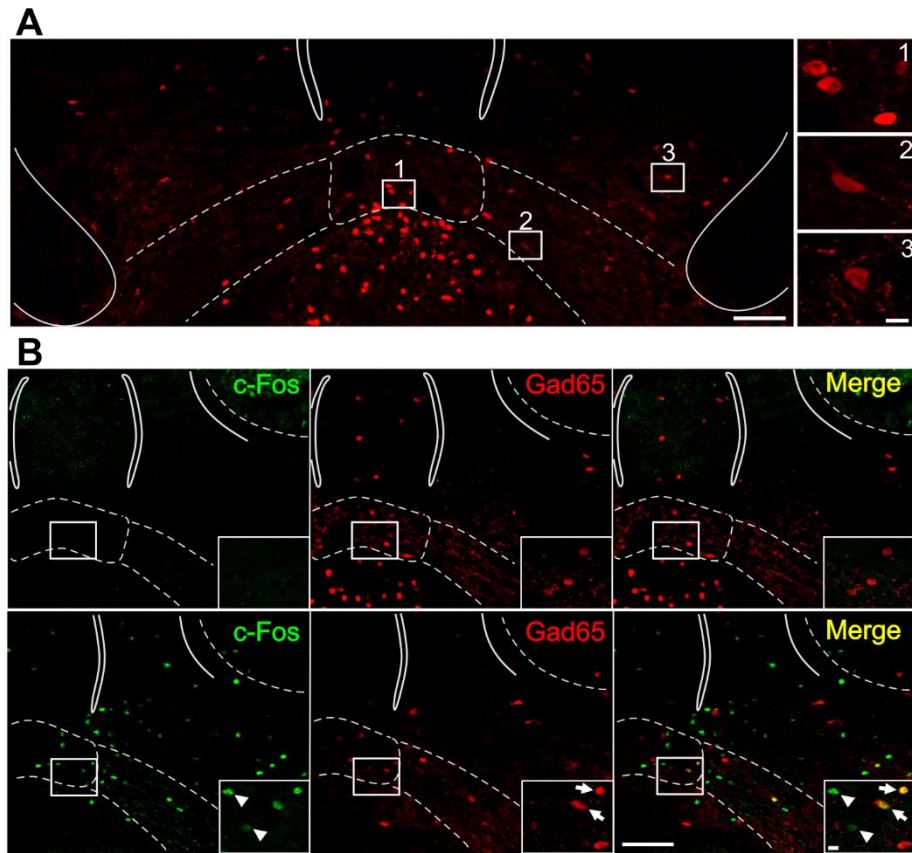


**Figura 14. Las neuronas del AVT y del Acb responden a ghrelin administrada por vía ICV.** Los Paneles A y B muestran el análisis cuantitativo de la ingesta de dieta estándar (A) y de la distancia recorrida (B) luego de la administración por vía ICV de LCRa o ghrelin. \*\*\*,  $p < 0,001$  vs vehículo ICV, test t de Student (ingesta) y \*,  $p < 0,05$  vs vehículo ICV, test t de Student apareado (actividad locomotora). Los Paneles C y G muestran microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones WT sometidos a una inmuno-tinción

doble anti-TH y anti-c-Fos. Las microfotografías muestran cortes coronales representativos del AVT (**C**) y del NAcb (**G**) de ratones tratados con LCRa o ghrelina por vía ICV. Los animales tratados con ghrelina fueron separados en dos grupos de acuerdo a si tuvieron acceso a dieta estándar durante las 2 horas pos-inyección (grupo Ghrelina ICV + comida) o permanecieron sin acceso a la dieta luego de la inyección (grupo Ghrelina ICV - comida). Los insertos en los paneles de microfotografías muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por rectángulos en las fotos de baja magnificación. Las flechas apuntan a neuronas TH+ mientras que las puntas de flecha apuntan a neuronas c-Fos+/TH-. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación. En todos los casos, un esquema con las subdivisiones de cada núcleo de acuerdo al Atlas de Paxinos y Franklin (2001) se superpuso en cada imagen. Los **Paneles D-F y H-J** muestran el análisis cuantitativo del número de neuronas c-Fos+/TH- en los distintos sub-núcleos del AVT, IF (**D**), PN (**E**) y PBP (**F**) y en las distintas subdivisiones del NAcb, NAcbC (**H**), NAcbMSh (**I**) y NAcbLSH (**J**). \*,  $p < 0,05$  vs vehículo; \*\*,  $p < 0,01$  vs vehículo y \*\*\*,  $p < 0,001$  vs vehículo, ANOVA de una vía seguido de un pos-test de Bonferroni (MAcbSh) o Kruskal-Wallis seguido de un pos-test de Dunn (AcCb, LAcbSh, IF, PN, PBP).

Como los resultados en los apartados anteriores mostraron que la mayor inducción de c-Fos se daba en las neuronas no dopaminérgicas, decidimos estudiar si la ghrelina puede actuar sobre las neuronas GABA del AVT. Para ello, se emplearon ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  a los que se inyectó ICV con ghrelina o con LCRa. Los ratones se perfundieron, se extrajeron sus cerebros, se cortaron y una de las series se empleó para una inmuno-tinción fluorescente contra c-Fos. El número de neuronas  $tdTomate+$  en el AVT de los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  se estimó en ~500, ~200 y ~500 en el IF, PN y PBP, respectivamente (Figura 15A). Las características neuroanatómicas de las células  $tdTomate+$  en cada sub-región fueron levemente distintas: las células  $tdTomate+$  del IF eran pequeñas (~9  $\mu$ m) y agrupadas en la línea media, las células  $tdTomate+$  del PN eran también pequeñas (~9  $\mu$ m) y orientadas de forma semi-lateral, y las células  $tdTomate+$  del PBP presentaron un tamaño medio (~11  $\mu$ m) y no mostraron una orientación definida (Figura 15A). Comparado con el tratamiento con LCRa, los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  inyectados con ghrelina presentaron un aumento en el número de células c-Fos+ en el AVT, similar a lo observado en ratones WT. Además, la inyección ICV de ghrelina aumentó la fracción de células c-Fos+/ $tdTomate+$  exclusivamente en el IF, comparado con el tratamiento con LCRa (16,5 $\pm$ 4,6 vs 1,0 $\pm$ 1,0% del total de células  $tdTomate+$ , respectivamente). La administración ICV de ghrelina no afectó el porcentaje de células c-Fos+/ $tdTomate+$  ni en el PN (11,4 $\pm$ 5,2 vs 2,0 $\pm$ 2,0% del total de células  $tdTomate+$ ) ni en el PBP (7,0 $\pm$ 5,3 vs 0,0 $\pm$ 0,0% del total de células  $tdTomate+$ ) de los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$ , comparado con el porcentaje hallado en los ratones tratados con LCRa.



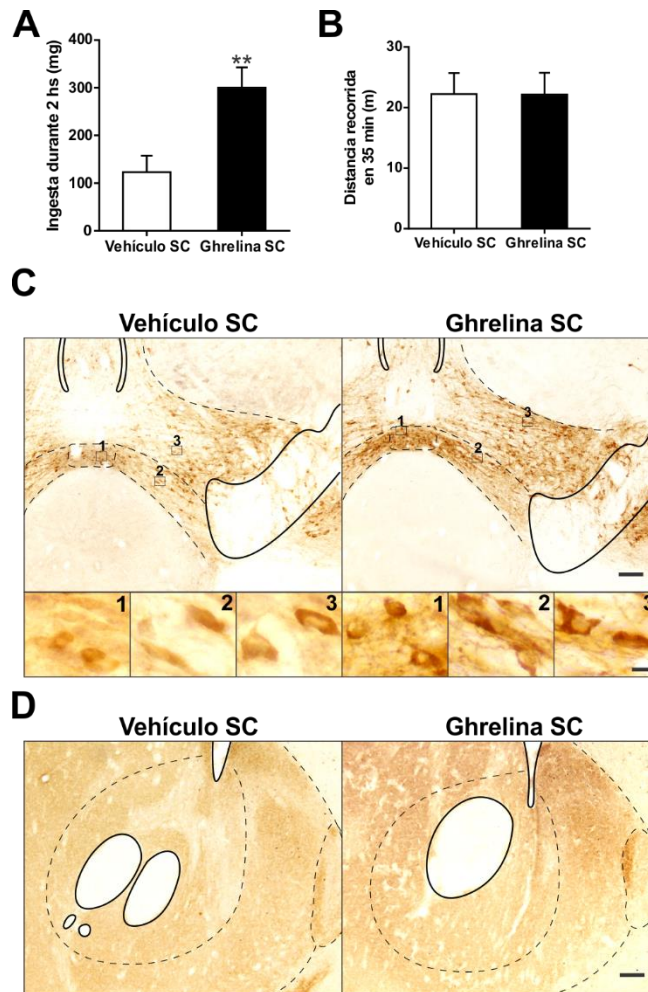


**Figura 15. Las neuronas GABA del AVT responden a ghrelina administrada por vía ICV.** El **Panel A** muestra una microfotografía representativa de un corte coronal del AVT de un ratón  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  mostrando la presencia de neuronas GABA en los tres sub-núcleos del AVT. Los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por rectángulos en la imagen de baja magnificación. El **Panel B** de la figura muestra microfotografías representativas de cortes coronales del cerebro de ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  sometidos a una inmuno-tinción fluorescente contra c-Fos. Los ratones fueron tratados por vía ICV con LCRa (fila superior) o con ghrelina (fila inferior) y la primera columna muestra la señal c-Fos+ en ambas condiciones, la columna del medio, la señal tdTomate+ y la columna de la derecha, el merge de las dos señales mencionadas. En todos los casos, un esquema de los sub-núcleos del AVT de acuerdo a Paxinos y Franklin (2001) se superpuso a la imagen. Los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por rectángulos en las imágenes de baja magnificación. Las puntas de flecha apuntan a células c-Fos+, las flechas apuntan a neuronas c-Fos+/tdTomate+. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación.

## 4. Estudio del efecto de la administración sistémica de ghrelina sobre los núcleos del circuito mesolímbico

Para estudiar si aumentos en la concentración plasmática de ghrelina afectan la actividad de las neuronas del circuito mesolímbico, se realizaron administraciones subcutáneas de la hormona y estudiamos la inducción de c-Fos y el efecto sobre la actividad locomotora de ratones WT. La inyección subcutánea de ghrelina aumentó la ingesta de dieta estándar durante las 2 horas pos-inyección en ratones alimentados *ad libitum* (Figura 16A), mientras que no modificó la actividad locomotora de animales que no tienen acceso a alimento (Figura 16B). Como ya se ha mostrado en estudios previos del laboratorio, la administración subcutánea de ghrelina aumenta el número de células c-Fos+ en el ARC, comparado con los números hallados en el ARC de ratones a los que

se administra con vehículo (Cabral et al., 2014). La administración subcutánea de ghrelina no afectó el número de células c-Fos+ ni en el AVT (Figura 16C) ni el NAcb (Figura 16D), comparado con los números hallados en los ratones tratados con salina.



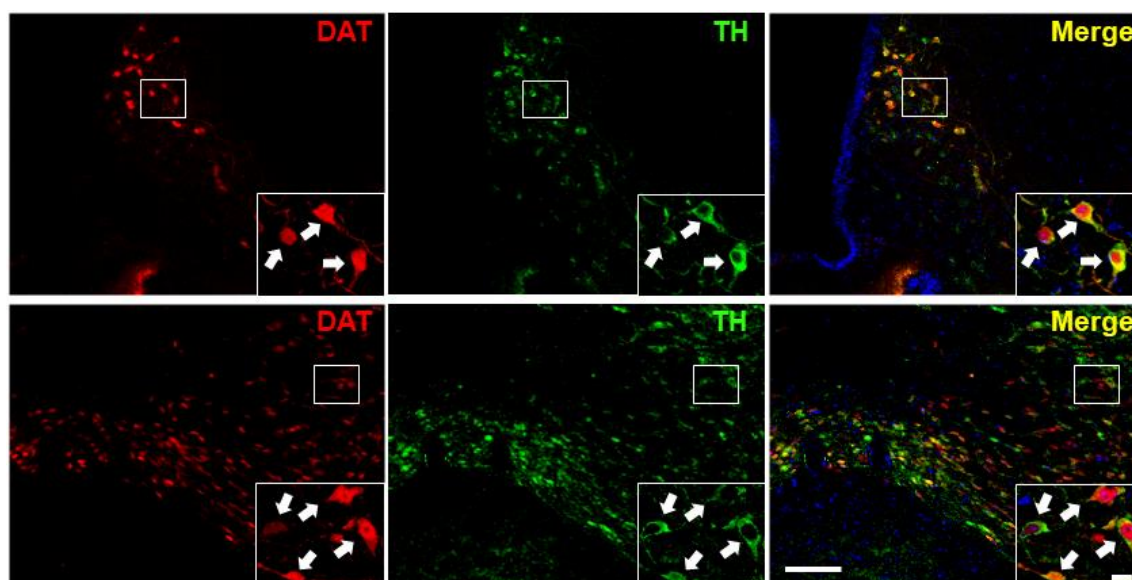
**Figura 16. Las neuronas del AVT y del Acb no responden a la ghrelina administrada por vía subcutánea.** Los Paneles A y B muestran el análisis cuantitativo de la ingesta de dieta estándar (A) y de la distancia recorrida (B) luego de la administración por vía SC de LCRA o ghrelina. Los Paneles C y G muestran microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratones WT sometidos a una inmuno-tinción doble anti-TH y anti-c-Fos. Las microfotografías muestran cortes coronales representativos del AVT (C) y del NAcb (G) de ratones tratados con salina o con ghrelina por vía subcutánea. Los insertos en los paneles de microfotografías muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por rectángulos en las fotos de baja magnificación. Barras de escala: 100  $\mu$ m, baja magnificación y 10  $\mu$ m, alta magnificación. En todos los casos, un esquema con las subdivisiones de cada núcleo de acuerdo al Atlas de Paxinos y Franklin (2001) se superpuso en cada imagen. \*\*,  $p < 0,01$  vs vehículo, test t de Student.

## 5. Estudio de las implicancias de la presencia del GHSR exclusivamente las neuronas dopaminérgicas

De acuerdo a resultados publicados previamente, tanto la población de neuronas dopaminérgicas como las neuronas GABA del AVT expresan el GHSR (Abizaid et al., 2006). Además, de acuerdo a nuestros resultados, ambas poblaciones neuronales del AVT aumentan los niveles de c-Fos en respuesta a la administración central de ghrelina. Dado que la población mayoritaria de neuronas del AVT es la población dopaminérgica, decidimos

estudiar el efecto de la re-expresión selectiva del GHSR en dicha población neuronal. En particular, utilizamos un modelo de ratón que expresa la recombinasa Cre corriente abajo del gen del transportador de dopamina ( $\text{Dat}^{\text{cre/+}}$ ) y lo cruzamos con los ratones deficientes en el GHSR ( $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$ ) para generar ratones con re-expresión del GHSR exclusivamente en neuronas dopaminérgicas.

Antes de emplear los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}$  en los estudios de re-expresión del GHSR, y a modo de verificación de que la recombinación fuera específica, realizamos cruza de los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}$  con ratones reporteros Ai14. Así, se cruzaron ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}$  con ratones Ai14 y los descendientes  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Rosa26}^{\text{tdTomate}}$  fueron perfundidos, se extrajeron sus cerebros y una de las series de cortes coronales se utilizó para una inmunotinción fluorescente contra TH (Figura 17). El análisis de los cortes coronales indicó que la mayor parte de las neuronas tdTomate+ también presentó señal TH+. En el ARC, el 94±5% de las neuronas tdTomate+ también fueron TH+ mientras que en la SN el 95±2% de las neuronas tdTomate+ también presentaron señal TH+. En el caso del AVT, el 86±1%, 97±1% y 98±1% de las neuronas tdTomate+ también fueron TH+ en el IF, PN y PBP, respectivamente. Al mismo tiempo, el 82±6%, 95±2%, 95±3%, 92±3% y 99±1% de las neuronas TH+ también presentaron señal tdTomate+ en el ARC, SN, IF, PN y PBP.

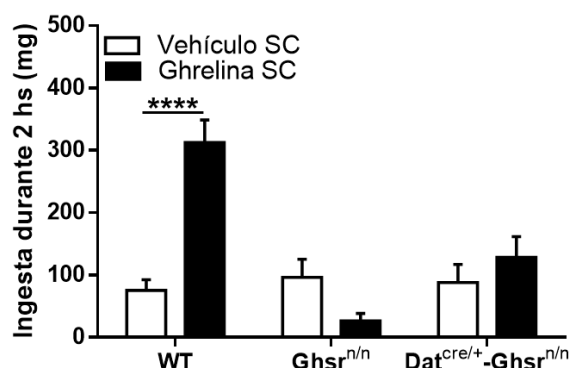


**Figura 17. El perfil de expresión de tdTomate en los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Rosa26}^{\text{tdTomate}}$  es congruente con el perfil de expresión de TH.** El Panel muestra microfotografías representativas de cortes coronales de cerebro de ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Rosa26}^{\text{tdTomate}}$  sometidos a una inmuno-tinción fluorescente contra TH. La columna de la izquierda muestra la señal tdTomate+, la columna del medio muestra la TH+ y la columna de la derecha muestra el merge entre ambas señales. La fila superior muestra imágenes correspondientes al ARC, mientras que la fila inferior muestra imágenes correspondientes al AVT. Los insertos muestran, en alta magnificación, las áreas delimitadas por rectángulos en las imágenes de baja magnificación. Las flechas apuntan a neuronas tdTomate+/TH+. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ , baja magnificación y 10  $\mu\text{m}$ , alta magnificación.

Una vez establecida la capacidad de la recombinasa Cre de reactivar la expresión de tdTomate exclusivamente en neuronas dopaminérgicas, se realizó un estudio del patrón de re-expresión del GHSR en los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$ . Se realizaron micro-disecciones de distintos núcleos cerebrales de ratones WT, ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  y

ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$ , y la cantidad de ARNm del GHSR se cuantificó a través de PCR tiempo real. Los resultados mostraron que el ARC de ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  presentan un nivel de ARNm de GHSR menor comparado con los ratones WT. Los niveles de ARNm del GHSR encontrados en el ARC de ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  fue de ~20% de los encontrados en los animales WT. Al mismo tiempo, los ARC de ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  mostraron niveles de ARNm del GHSR de ~80% de lo que muestran los animales WT. En el caso del AVT, los ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  presentaron niveles de expresión del GHSR de ~20% de los obtenidos para los animales WT, mientras que los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  mostraron niveles de ~70% de los niveles de los ratones WT.

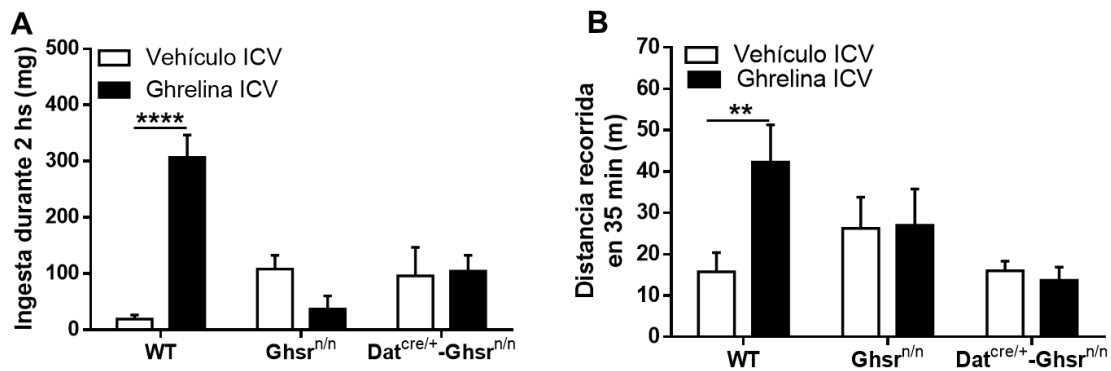
A continuación, se evaluó la respuesta de los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  a la administración de ghrelina. En primer lugar, se inyectaron ratones WT,  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  y  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  con ghrelina por vía subcutánea y se evaluó la ingesta de los animales. La administración subcutánea de ghrelina aumentó la ingesta de dieta estándar de los ratones WT respecto de sus propios valores de ingesta en respuesta a la administración de salina (Figura 18). En cambio, la administración subcutánea de ghrelina tanto en los ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  como en los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  no cambió la ingesta de dieta estándar comparado con sus respectivos valores de ingesta en respuesta a salina (Figura 18).



**Figura 18. Los ratones  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  no aumentan la ingesta de dieta estándar en respuesta a la administración subcutánea de ghrelina.** El Panel muestra el análisis cuantitativo de la ingesta de dieta estándar de ratones WT,  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  y  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  en respuesta a la administración subcutánea de salina o ghrelina. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  ANOVA de dos vías seguido de un pos-test de Bonferroni.

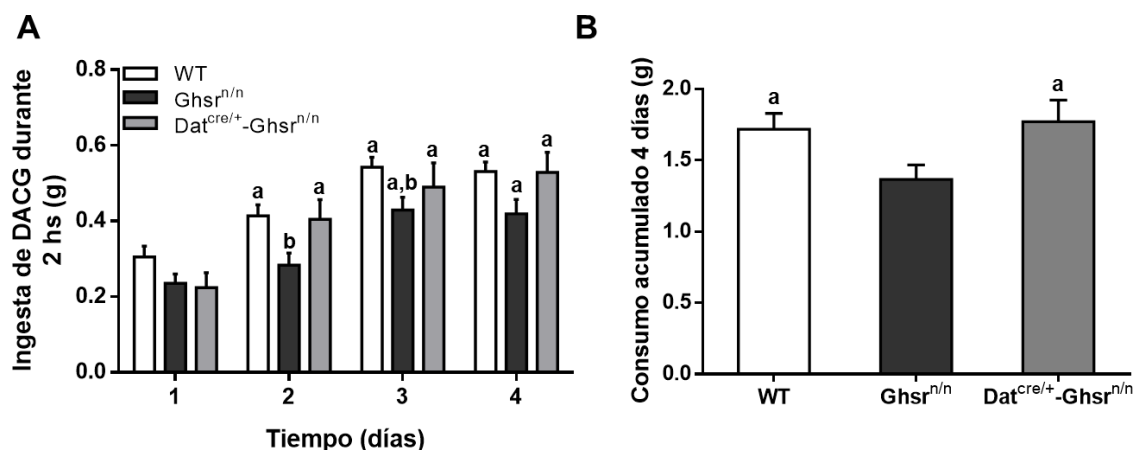
Más adelante, se realizaron inyecciones ICV de ghrelina en ratones WT,  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  y  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$  y se controló, en dos sets de experimentos separados, la ingesta de dieta estándar y la actividad locomotora en respuesta a ghrelina. La administración ICV de ghrelina en ratones WT aumentó la ingesta de dieta estándar respecto de sus propios valores en respuesta a la administración de LCRa (Figura 19A). En el caso de los ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  y  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$ , la inyección ICV de ghrelina no produjo cambios en la ingesta de dieta estándar comparado con sus propios valores en respuesta a la administración de LCRa (Figura 19A). Con respecto a la respuesta locomotora, la inyección ICV de ghrelina a ratones WT aumentó la distancia recorrida ~3 veces respecto de sus propios valores en respuesta a LCRa (Figura 19B). En el caso de los ratones  $\text{Ghsr}^{\text{n/n}}$  y  $\text{Dat}^{\text{cre/+}}\text{-Ghsr}^{\text{n/n}}$ , la

administración ICV de ghrelina no produjo cambios en la actividad locomotora comparado con los valores observados al administrar los animales con LCRa (Figura 19B).



**Figura 19. Los ratones  $Dat^{cre/+}-Ghshn/n$  no aumentan la ingesta de dieta estándar ni la actividad locomotora en respuesta a la administración central de ghrelina.** El **Panel A** muestra el análisis cuantitativo de la ingesta de dieta estándar de ratones WT,  $Ghshn/n$  y  $Dat^{cre/+}-Ghshn/n$  en respuesta a la administración ICV de LCRa o ghrelina. El **Panel B** muestra el análisis cuantitativo de la actividad locomotora de ratones WT,  $Ghshn/n$  y  $Dat^{cre/+}-Ghshn/n$  en respuesta a la administración ICV de LCRa o ghrelina. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . ANOVA de dos vías seguido de un pos-test de Bonferroni.

Finalmente, evaluamos el comportamiento de los ratones  $Dat^{cre/+}-Ghshn/n$  frente al protocolo de atracón por exposición limitada e intermitente a DACG previamente descrito. Por estudios previos de nuestro laboratorio, sabemos que el protocolo de atracón produce una activación del circuito mesolímbico e involucra la actividad del sistema de ghrelina y GHSR, ya que los animales  $Ghshn/n$  presentan un patrón de hiperfagia distinto al de los animales WT (Valdivia et al., 2015). En este caso, tanto los ratones  $Dat^{cre/+}-Ghshn/n$  como ratones WT y  $Ghshn/n$  se expusieron durante 2 horas por cuatro días consecutivos a un pellet de DACG y se controló la ingesta durante las 2 horas de exposición (Figura 20A). Tanto los ratones WT, como los  $Ghshn/n$  y los  $Dat^{cre/+}-Ghshn/n$  consumieron cantidades crecientes de DACG a lo largo de los días de protocolo (Figura 20A). Cuando se comparó el consumo acumulado de DACG durante los cuatro días de protocolo de los tres genotipos, se observó que tanto los animales WT como los animales  $Dat^{cre/+}-Ghshn/n$  consumen cantidades mayores de DACG respecto de lo que consumen los animales  $Ghshn/n$  (Figura 20B).

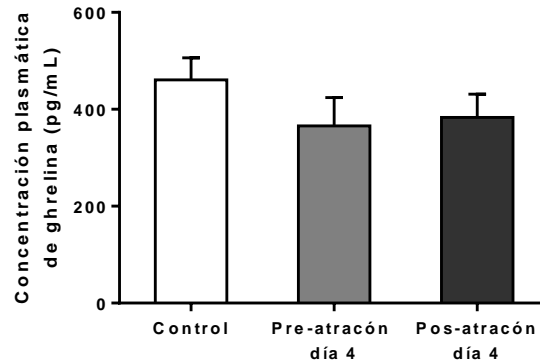


**Figura 20. Los ratones  $Dat^{cre/+}$ - $Ghslr^{nl/n}$  muestran una ingesta de DACG similar a la de los ratones WT en el protocolo de atracón.** El **Panel A** muestra el análisis cuantitativo de la ingesta durante las dos horas de exposición a DACG de ratones WT,  $Ghslr^{nl/n}$  y  $Dat^{cre/+}$ - $Ghslr^{nl/n}$  en el protocolo de atracón. a,  $p < 0,05$  vs día 1 de su propio genotipo y b,  $p < 0,05$  vs WT en el mismo día experimental. ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido de un pos-test de Tukey. El **Panel B** muestra el análisis cuantitativo del consumo de DACG acumulado durante los cuatro días del protocolo de atracón de ratones WT,  $Ghslr^{nl/n}$  y  $Dat^{cre/+}$ - $Ghslr^{nl/n}$ . Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. a,  $p < 0,05$  vs  $Ghslr^{nl/n}$ . ANOVA de una vía seguido de un pos-test de Tukey.

## 6. Estudio el rol del sistema de ghrelina y GHSR sobre la ingesta de alimento regulada por el circuito mesolímbico

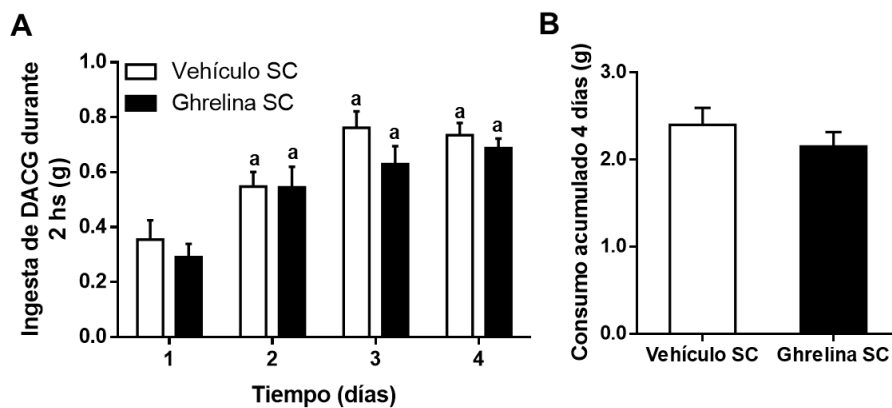
Habiendo obtenido resultados que indicaron que la presencia del GHSR en las neuronas dopaminérgicas restaura el fenotipo de ingesta de DACG que se observa en los ratones WT, decidimos estudiar si el rol modulador del sistema de ghrelina y GHSR sobre el perfil de escalado que se observa en la ingesta de DACG en el protocolo de atracón depende de la actividad evocada por ghrelina o de la actividad constitutiva del GHSR.

En primer lugar, estudiamos si la exposición de los ratones de forma limitada e intermitente a DACG cambia los niveles plasmáticos de ghrelina. Para ello, medimos los niveles plasmáticos de ghrelina en ratones que sólo tienen acceso a dieta estándar durante los cuatro días del protocolo (grupo control), en ratones que consumen DACG durante 3 días y el cuarto día de protocolo se les extrae sangre antes de consumir la DACG (grupo pre-atracón día 4) y en ratones que consumen DACG durante los 4 días del protocolo y se les extrae sangre inmediatamente después de consumir DACG el cuarto día de protocolo (grupo pos-atracón día 4). Los ratones del grupo pre-atracón consumieron  $336 \pm 72$  mg,  $388 \pm 51$  mg y  $412 \pm 50$  mg de DACG el primer, segundo y tercer día de protocolo, respectivamente, mientras que los ratones del grupo pos-atracón ingirieron  $373 \pm 77$  mg,  $499 \pm 133$  mg,  $494 \pm 98$  mg y  $501 \pm 73$  mg de DACG el primer, segundo, tercer y cuarto día de protocolo. Las medidas de ghrelina plasmática no arrojaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Figura 21).



**Figura 21. Los ratones expuestos al protocolo de atracón no muestran diferencias en los niveles plasmáticos de ghrelina.** El Panel muestra el análisis cuantitativo de los niveles plasmáticos de ghrelina hallados en ratones controles, ratones expuestos al protocolo de atracón a los que se les tomó muestra el cuarto día antes de consumir la DACG (grupo pre-atracón día 4) y ratones expuestos al protocolo de atracón a los que se les tomó muestra el cuarto día después de consumir la DACG (grupo pos-atracón día 4).

A continuación, se realizaron inyecciones subcutáneas de ghrelina para simular un aumento en la concentración plasmática de la hormona y analizar el efecto del mismo sobre la ingesta de DACG de ratones WT. La administración subcutánea de ghrelina no cambió el perfil de ingesta de los ratones expuestos de forma limitada e intermitente a DACG (Figura 22A). Tanto en el grupo de ratones inyectados con salina, como en el grupo de ratones inyectados con ghrelina se observaron diferencias entre los valores de ingesta de DACG al segundo, tercer y cuarto día respecto del primer día del protocolo (Figura 22A). No se observaron diferencias entre el consumo acumulado de ambos grupos a lo largo del protocolo (Figura 22B), ni diferencias en el peso corporal de los animales al cuarto día de protocolo ( $25,6 \pm 1,2$  g salina vs  $23,6 \pm 1,1$  g ghrelina). Estos animales tampoco presentaron, a pesar de haber ingerido grandes cantidades de DACG durante las 2 horas de exposición, una compensación en la ingesta nocturna de dieta estándar. Los animales inyectados con salina consumieron  $3,81 \pm 0,18$  g;  $3,82 \pm 0,17$  g y  $3,55 \pm 0,23$  g de dieta estándar durante la primera, segunda y tercera noche, respectivamente, y los inyectados con ghrelina,  $3,54 \pm 0,28$  g;  $3,78 \pm 0,32$  g y  $3,48 \pm 0,26$  g.

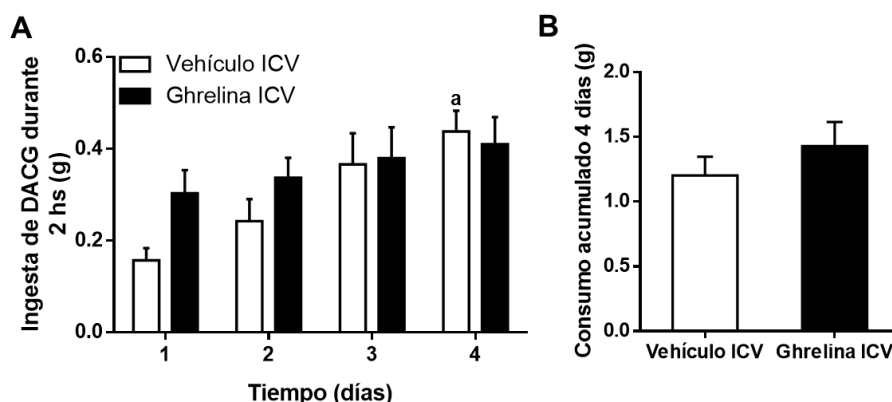


**Figura 22. Los ratones inyectados con ghrelina por vía subcutánea no muestran diferencias en la ingesta de DACG en el protocolo de atracón.** El Panel A muestra el análisis cuantitativo de la ingesta de DACG durante las dos horas de exposición a DACG de ratones



inyectados por vía subcutánea con salina o con ghrelina en el protocolo de atracón. a,  $p < 0,05$  vs día 1 del mismo tratamiento. ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido de un pos-test de Tukey. El **Panel B** muestra el análisis cuantitativo del consumo de DACG acumulado durante los cuatro días del protocolo de atracón de ratones WT inyectados por vía subcutánea con salina o con de ghrelina. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

Luego, estudiamos el efecto de la modulación de la actividad del GHSR sobre la ingesta de DACG. En primer lugar, realizamos inyecciones ICV de ghrelina para estudiar el efecto de la actividad evocada del GHSR. La administración central de ghrelina modificó el patrón de ingesta de los ratones expuestos a DACG, ya que los ratones que recibieron LCRa mostraron diferencias en la ingesta entre el cuarto y el primer día de protocolo, mientras que los ratones que recibieron ghrelina no presentaron diferencias en la ingesta de DACG a lo largo de los días (Figura 23A). En estos experimentos, se observó una tendencia a que los ratones inyectados con ghrelina ingieran mayor cantidad de DACG el primer día de protocolo, aunque esa diferencia no alcanzó significancia estadística ( $p = 0,3130$  por pos-test de Bonferroni luego de un ANOVA de dos vías;  $p = 0,0185$  por t test sólo comparando el día 1). Además, no se detectaron diferencias en el peso corporal de los animales al cuarto día de protocolo ( $23,7 \pm 0,7$  g LCRa vs  $23,7 \pm 0,5$  g ghrelina). Tampoco se observaron diferencias en la ingesta acumulada de DACG a lo largo del protocolo entre ambos grupos (Figura 23B) ni en la ingesta nocturna de los animales en ambos grupos experimentales. Los animales inyectados con LCRa ingirieron  $3,14 \pm 0,36$  g,  $2,59 \pm 0,41$  g y  $3,19 \pm 0,20$  g de dieta estándar durante la primera, segunda y tercera noche, respectivamente, y los inyectados con ghrelina,  $3,36 \pm 0,15$  g,  $3,47 \pm 0,15$  g y  $3,54 \pm 0,16$  g.

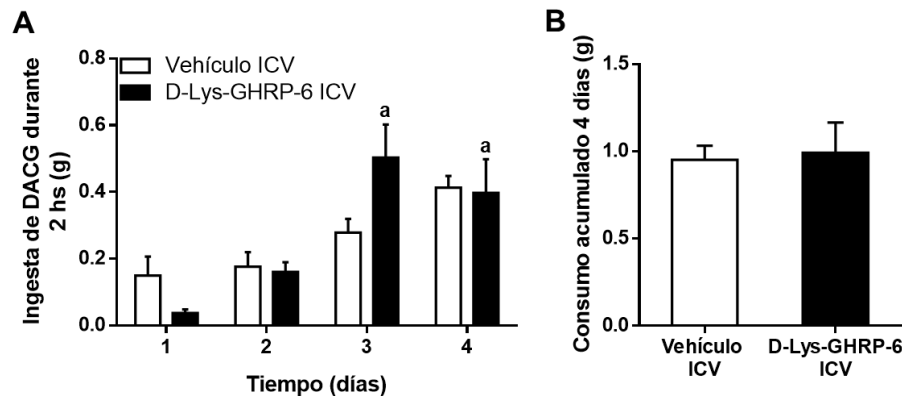


**Figura 23. Los ratones inyectados con ghrelina por vía ICV no escalan el consumo de DACG.** El **Panel A** muestra el análisis cuantitativo de la ingesta de DACG durante las dos horas de exposición a DACG de ratones inyectados por vía ICV con LCRa o con ghrelina en el protocolo de atracón. a,  $p < 0,05$  vs día 1 del mismo tratamiento. ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido de un pos-test de Tukey. El **Panel B** muestra el análisis cuantitativo del consumo de DACG acumulado durante los cuatro días del protocolo de atracón de ratones WT inyectados por vía ICV con LCRa o con ghrelina.

A continuación, se inyectaron ratones WT por vía ICV con un antagonista del GHSR, el D-Lys-GHRP-6, que bloquea la actividad del receptor evocada por ghrelina, y se estudió el efecto del mismo sobre la ingesta de DACG de los animales. La administración central de D-Lys-GHRP-6 no cambió el perfil de consumo de DACG (Figura 24A). Tanto los ratones inyectados con LCRa como los inyectados con D-Lys-GHRP-6 mostraron diferencias en los valores de ingesta de DACG entre el cuarto y el primer día del protocolo (Figura 24A). Además, no hubo diferencias en la ingesta acumulada de DACG a lo largo del protocolo entre ambos grupos

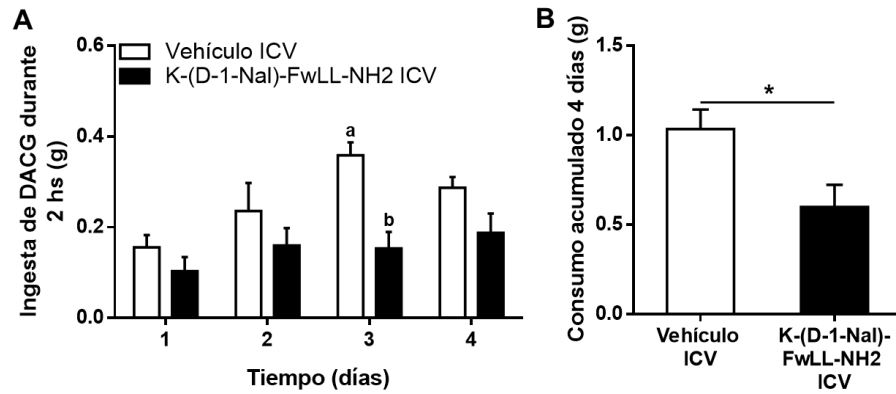


(Figura 24B) ni en el peso corporal de los animales de ambos grupos al cuarto día experimental ( $21,7 \pm 1,2$  g LCRa vs  $22,5 \pm 0,8$  D-Lys-GHRP-6). Nuevamente, ninguno de los grupos de ratones mostró una compensación en la ingesta nocturna. Los animales inyectados con LCRa ingirieron  $2,69 \pm 0,31$  g,  $3,59 \pm 0,37$  g y  $3,53 \pm 0,29$  g de dieta estándar durante la primera, segunda y tercera noche, respectivamente, y los inyectados con D-Lys-GHRP-6,  $3,71 \pm 0,23$  g,  $3,66 \pm 0,27$  g y  $3,47 \pm 0,28$  g.



**Figura 24. Los ratones inyectados con D-Lys-GHRP-6 por vía ICV no muestran diferencias en la ingesta de DACG en el protocolo de atracón respecto de ratones inyectados con LCRa.** El Panel A muestra el análisis cuantitativo de la ingesta de DACG durante las dos horas de exposición a DACG de ratones inyectados por vía ICV con LCRa solo o con D-Lys-GHRP-6 en el protocolo de atracón. a,  $p < 0,05$  vs día 1 del mismo tratamiento. ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido de un pos-test de Tukey. Grupo Vehículo ICV,  $p = 0,0730$  para día 4 vs día 1. El Panel B muestra el análisis cuantitativo del consumo de DACG acumulado durante los cuatro días del protocolo de atracón de ratones WT inyectados por vía ICV con LCRa o con D-Lys-GHRP-6. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

Finalmente, se realizó un set de experimentos en los que se inyectaron ratones WT por vía ICV con un agonista inverso del GHSR, el K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>, que bloquea la actividad constitutiva del receptor y se estudió el efecto del mismo sobre la ingesta de DACG de los ratones. En este caso, se observaron diferencias en el consumo de DACG entre el primer y el tercer día de exposición a DACG de los animales inyectados por vía ICV con LCRa (Figura 25A), mientras que los ratones inyectados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> presentaron un perfil de consumo a lo largo del protocolo distinto al de los animales inyectados con LCRa. Los animales inyectados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> no presentaron diferencias significativas en la ingesta de DACG entre los días sucesivos de protocolo. Al mismo tiempo, se evidenció que los animales inyectados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>, respecto de los inyectados con LCRa, consumieron cantidades menores de DACG el tercer día de acceso a la dieta. Al comparar el consumo acumulado en los 4 días experimentales, se observó que los animales inyectados con el agonista inverso consumieron, en promedio, una cantidad menor que los ratones a los que se les administró LCRa (Figura 25B). No se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los animales al cuarto día experimental ( $26,2 \pm 1,6$  g LCRa vs  $24,3 \pm 0,7$  g K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>) y ninguno de los grupos de ratones mostró una compensación en la ingesta nocturna ya que los animales inyectados con LCRa ingirieron  $3,91 \pm 0,35$  g,  $3,52 \pm 0,23$  g y  $3,20 \pm 0,39$  g de dieta estándar durante la primera, segunda y tercera noche, respectivamente, y los inyectados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>,  $3,54 \pm 0,27$  g,  $3,76 \pm 0,26$  g y  $3,94 \pm 0,24$  g.



**Figura 25. Los ratones inyectados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> por vía ICV no escalan la ingesta de DACG en el protocolo de atracón y consumen menores cantidades de DACG respecto de animales inyectados con LCRA.** El **Panel A** muestra el análisis cuantitativo de la ingesta de DACG durante las dos horas de exposición a DACG de ratones inyectados por vía ICV con LCRA o con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> en el protocolo de atracón. a,  $p < 0,05$  vs día del mismo tratamiento y b,  $p < 0,05$  vs Vehículo ICV el mismo día. ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido de un pos-test de Tukey y Bonferroni, respectivamente. El **Panel B** muestra el análisis cuantitativo del consumo de DACG acumulado durante los cuatro días del protocolo de atracón de ratones WT inyectados por vía ICV con LCRA o con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. \*,  $p < 0,05$ . Test t de Student.

## DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis estudiamos el rol que cumple el sistema de ghrelina y GHSR en núcleos cerebrales situados en el tallo encefálico mediante el empleo de distintas herramientas, entre ellas, el uso de ratones modificados genéticamente, análisis neuroanatómicos y análisis de conducta animal en protocolos de trabajos específicos. El conjunto de estas herramientas permitió clarificar el rol que desempeña el sistema de ghrelina y GHSR en el complejo dorsal del vago y en el circuito mesolímbico. Antes de abordar la discusión de los resultados particulares obtenidos en los distintos apartados de este trabajo de Tesis, vale la pena mencionar algunas características de las herramientas utilizadas.

Los ratones en general representan una herramienta muy valiosa a la hora de realizar estudios biológicos y, en particular, en el área de neurociencias. Las grandes ventajas que presenta el empleo de ratones modificados genéticamente en estudios neurobiológicos son, entre otras, la gran variedad de modelos disponibles, el bajo costo de mantenimiento de los animales, comparado con ratas o animales de mayor porte, y el menor tiempo y dinero que demanda el procesamiento del tejido cerebral. En contrapartida, podría decirse que el pequeño tamaño del cerebro de los ratones hace que algunas técnicas sean más difíciles de aplicar en ratones que en animales de mayor tamaño y, por otro lado, el desempeño de los ratones en paradigmas comportamentales suele ser peor que el de las ratas (Ellenbroek and Youn, 2016). En el caso particular de este trabajo de Tesis, se emplearon varios modelos de ratones modificados genéticamente: los ratones reporteros  $Ghsr^{eGFP}$  y  $Ai14$ , los ratones deficientes en el receptor de ghrelina  $Ghsr^{n/n}$ , y los ratones  $Dat^{cre/+}$  y  $Gad2^{cre/+}$  en los que la expresión de la recombinasa Cre se da en las neuronas dopaminérgicas y en una subpoblación de neuronas GABA, respectivamente. Para cada uno de los modelos empleados podrían numerarse ventajas y desventajas de las que cabe destacar algunas en cada caso.

Los animales  $Ghsr^{n/n}$  empleados en este trabajo de Tesis fueron generados por el Dr. Zigman y representan una herramienta valiosa para estudiar el sistema de ghrelina y GHSR, ya que la expresión del GHSR está bloqueada por un casete de bloqueo de la transcripción removible por acción de la recombinasa Cre (Zigman et al., 2005). En particular, utilizamos a los ratones  $Ghsr^{n/n}$  como modelo de animal que no expresa el GHSR, aunque podría especularse que una mejor opción para eliminar la expresión del receptor sería un modelo de animales *knock-out*, en el que se haya eliminado por completo el gen del GHSR. Sin embargo, en estudios previos, se ha mostrado que la expresión del GHSR en los distintos núcleos cerebrales de los ratones  $Ghsr^{n/n}$  es muy baja (Chuang et al., 2011; Zigman et al., 2005). Por otro lado, el casete de bloqueo de la transcripción insertado en el gen del GHSR de estos animales consta de secuencias que dificultan la acción de la ARN polimerasa (secuencias de pausa y poliA) y sitios aceptores de empalme, por lo que el ARNm que se pueda transcribir y detectar por técnicas como PCR tiempo real probablemente no sea funcional. Además, los ratones  $Ghsr^{n/n}$  no responden a los efectos orexigénicos de la ghrelina, lo que indica que pueden ser empleados como modelo deficiente del GHSR (Chuang et al., 2011; Zigman et al., 2005). Un hecho que no puede descartarse, tanto en los animales  $Ghsr^{n/n}$  como en cualquier modelo que carezca de la expresión de un gen desde estadios

embrionarios, es el fenómeno de compensación génica. Así, podría suceder que la falta de expresión del GHSR en los ratones  $Ghsr^{n/n}$  provoque cambios en la expresión de otros genes durante el desarrollo que compensen la falta del receptor y, como consecuencia, no se observen grandes diferencias fenotípicas entre animales adultos  $Ghsr^{n/n}$  y WT. Este hecho ha sido previamente estudiado con las neuronas AgRP/NPY del hipotálamo, cuya ablación desde estadíos embrionarios no tiene mayores efectos, pero la eliminación de las neuronas AgRP/NPY en animales adultos provoca la pérdida del apetito (Luquet et al., 2005). Entonces, los resultados obtenidos empleando modelos que carecen de la expresión de un gen desde estadíos embrionarios deben ser analizados con detenimiento. Por otro lado, una de las grandes ventajas que proveen los ratones  $Ghsr^{n/n}$  es que se puede reactivar la expresión del GHSR por escisión del casete de bloqueo de la transcripción de forma temporal y/o tejido específica. Así, los ratones  $Ghsr^{n/n}$  pueden cruzarse con cepas de ratones que expresen la recombinasa Cre en alguna población neuronal específica o se pueden inyectar virus que codifiquen para la enzima en núcleos cerebrales específicos con la finalidad de reactivar la expresión del GHSR en poblaciones neuronales específicas y así estudiar el rol que cumple el sistema de ghrelina y GHSR presente en esa población.

Otro tipo de modelo de ratón empleado en este trabajo de Tesis fueron los ratones reporteros. La utilización de ratones reporteros brinda una gran ventaja para estudiar poblaciones neuronales en los que el marcador de la población neuronal es difícil de detectar. En nuestro caso particular, empleamos a los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  para evidenciar la presencia de neuronas que expresan el GHSR y a los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomato}$  para poner de manifiesto la presencia de neuronas que expresan Gad65. Los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  fueron generados por inserción al azar en el genoma del ratón de un cromosoma bacteriano artificial que contiene la construcción con la proteína eGFP bajo el promotor del GHSR. De esta forma, la expresión de eGFP puede ser afectada por el contexto génico en donde se haya insertado la secuencia de interés y, por otro lado, la presencia de esta secuencia puede modificar la expresión de los genes presentes en la zona de inserción. Estudios previos demostraron que la expresión de eGFP en algunos núcleos cerebrales de los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  muestra un alto nivel de congruencia con la expresión endógena del GHSR (Mani et al., 2014), dentro de los cuales se encuentran el hipocampo y el AP. Al mismo tiempo, núcleos importantes para el sistema de ghrelina y GHSR como aquellos situados en el hipotálamo y en el mesencéfalo, no muestran buen nivel de co-expresión de eGFP y del ARNm del GHSR. Es por ello que en este trabajo de Tesis empleamos a los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  únicamente en el estudio de los núcleos cerebrales del complejo dorsal del vago, ya que en los mismos observamos una expresión alta de eGFP y, como se discutirá más adelante, el análisis de distintas técnicas de detección del GHSR indicó que los ratones  $Ghsr^{eGFP}$  son un buen modelo para el estudio del sistema de ghrelina y GHSR en el complejo dorsal del vago.

En el caso de los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomato}$ , los mismos provienen de la cruce de ratones reporteros Ai14 y animales  $Gad^{cre/+}$ . Los ratones reporteros Ai14 poseen el gen de la proteína fluorescente tdTomate insertado en el locus constitutivo Rosa26 y su expresión depende de que la recombinasa Cre escinda un casete de bloqueo de la transcripción que se encuentra corriente arriba del gen de tdTomate (Madisen et al., 2010). De

acuerdo a estudios previos, los ratones Ai14 resultan una herramienta útil como animal reportero que permite la identificación de distintas poblaciones neuronales en las que se pueda expresar la recombinasa Cre de modo específico (Madisen et al., 2010). Así, las células que expresen tdTomate luego de la acción de la recombinasa Cre se pueden identificar directamente en un microscopio de fluorescencia o también aislarse mediante *cell sorting*, permitiendo la utilización de estos animales en estudios que apliquen distintas técnicas de identificación celular. Una característica que observamos cuando utilizamos los ratones Ai14 en los modelos  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  y  $Dat^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  fue un alto nivel de fluorescencia del soma (tanto en la región citoplasmática como en la región nuclear) y prolongaciones de las neuronas que expresaban tdTomate. Esto probablemente se deba a la combinación de, al menos, dos factores: la acumulación de grandes cantidades de tdTomate desde que se induce/inicia la expresión hasta que se analiza el tejido cerebral y el hecho de que tdTomate es una proteína fluorescente muy brillante (Shaner et al., 2004). Por lo tanto, la localización celular de la proteína tdTomate probablemente no refleje aquella de la proteína cuyo gen guía la expresión. Por otro lado, se podría plantear que la acumulación de tdTomate sea tóxica para las neuronas. Sin embargo, no se han reportado casos de toxicidad celular en los modelos en los que se ha empleado tdTomate como proteína reportera (Madisen et al., 2010; Shaner et al., 2005).

Los ratones  $Gad2^{cre/+}$ , por su parte, forman parte de la familia de animales generados para el empleo de la tecnología Cre/LoxP. Este sistema consta de dos componentes, por un lado, la construcción génica que contiene una determinada secuencia flanqueada por los sitios LoxP (floreada) y, por el otro, la construcción génica conteniendo la secuencia de la recombinasa Cre que se expresa, en general, en algún tipo celular específico (McLellan et al., 2017). En el caso de los ratones  $Gad2^{cre/+}$  empleados en este trabajo de Tesis, el gen de la enzima se encuentra insertado corriente abajo del promotor del gen *Gad2*, de manera tal que las neuronas GABA que expresen *Gad65* también expresarán la recombinasa Cre. Un inconveniente que representa el hecho de que la secuencia de la Cre interrumpa el gen endógeno *Gad2* es que los ratones  $Gad2^{cre/+}$  deben mantenerse en heterocigosis, ya que la homocigosis de Cre puede afectar la expresión de *Gad65* con consecuencias adversas en el neurodesarrollo fetal. Además, en este modelo, la expresión de la enzima Cre depende de la inducción con tamoxifeno, ya que la secuencia de la recombinasa se encuentra fusionada a la del receptor de estrógenos y depende de que el tamoxifeno se una al receptor para que la recombinasa pueda migrar al núcleo celular e interactuar con la secuencia de ADN floreada (Taniguchi et al., 2011). Así, los ratones  $Gad2^{cre/+}$  presentan la ventaja de que se puede manipular el momento en que se produce la expresión de la recombinasa Cre y, de esta forma, la recombinación en el gen blanco. Por otro lado, la recombinación de la secuencia floreada dependerá del grado inducción de la expresión de la recombinasa que, a su vez, dependerá del grado en que el tamoxifeno alcance los tejidos blanco. Para el caso de los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$ , se han realizado estudios que muestran que la especificidad y la eficiencia de estos ratones para marcar las neuronas que expresan *Gad2* en la corteza cerebral es mayor al 90% (Taniguchi et al., 2011). En nuestro caso particular, empleamos a los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  para el estudio de una subpoblación de neuronas GABA del AP, del NTS y del AVT. En el caso del AVT, que se encuentra ubicado en una región del cerebro más profunda que el AP y el NTS, habría que tener en cuenta que el tamoxifeno

administrado por vía intraperitoneal podría no penetrar el tejido cerebral de la misma manera que en regiones más expuestas a factores circulantes como el ARC o el AP. Así, la cantidad de neuronas GABA observadas en el AVT de los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  podría ser menor a la que realmente expresa el gen  $Gad2$ . Finalmente, podría argumentarse que las neuronas GABA que, en lugar de  $Gad65$ , expresen la isoforma  $Gad67$  de la enzima  $Gad$  no se verán representadas por los ratones  $Gad2^{cre/+}$ - $Rosa26^{tdTomate}$  utilizados en este trabajo de Tesis. Podría plantearse que un mejor modelo para el estudio de las poblaciones neuronales GABA son los ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el control del gen del transportador vesicular de GABA, el cual es expresado por todas las neuronas GABA (Wojcik et al., 2006). Sin embargo, este transportador también es expresado por la población de neuronas glicinérgicas, de modo que su empleo para el estudio exclusivo de las neuronas GABA tampoco sería adecuado.

Otro modelo que cuenta con la tecnología Cre/LoxP utilizado en este trabajo de Tesis es el de los ratones  $Dat^{cre/+}$ . En este caso, la secuencia conteniendo el gen de la recombinasa Cre se encuentra corriente abajo del gen del DAT y cuenta con una secuencia IRES (de sus siglas en inglés para *Internal Ribosome Entry Site*) que permite la traducción del ARNm bicistrónico conteniendo la secuencia del DAT y de la recombinasa. Así, la expresión de la enzima depende de la expresión propia del gen del transportador, no requiriendo la inducción exógena (Bäckman et al., 2006), con la desventaja de perder el control temporal de la expresión de la recombinasa. Esto puede llevar a que algunas neuronas que expresan DAT durante su desarrollo, pero que no lo hacen en su madurez, también sean consideradas dentro de la población neuronal dopaminérgica, sobreestimando el número final de estas neuronas. Al mismo tiempo, el hecho de no tener que inducir la expresión de la recombinasa ofrece la ventaja de eliminar la variabilidad dada por la inducción de la expresión de Cre con tamoxifeno. Por otro lado, el gen de la recombinasa en estos ratones no interrumpe la secuencia endógena del DAT, de modo que pueden generarse animales homocigotos para Cre a fin de disminuir el tiempo requerido para generar los animales con el genotipo deseado. En estudios previos se ha mostrado que los ratones  $Dat^{cre/+}$  son un modelo que presenta un alto nivel de fidelidad entre la expresión de la recombinasa y la expresión endógena de DAT y de otros marcadores de neuronas dopaminérgicas, como TH (Bäckman et al., 2006). Sin embargo, también se han reportado incongruencias en algunos núcleos cerebrales (Yip et al., 2018). Así, en este trabajo de tesis cruzamos a los ratones  $Dat^{cre/+}$  con los ratones reporteros Ai14 para analizar el grado de co-localización entre la señal de tdTomate y la señal de TH, detectada por inmuno-tinción, en los núcleos cerebrales estudiados. De forma similar a lo que mostraron los estudios previos, encontramos un buen nivel de co-localización entre ambas señales tanto en el ARC como en el AVT y la SN, indicando que la expresión de la recombinasa en ambos núcleos se da específicamente en las neuronas dopaminérgicas. Además, al cruzar a los animales  $Dat^{cre/+}$  con los ratones  $Ghsr^{n/n}$ , obtuvimos resultados que muestran que la re-expresión del GHSR se da en las poblaciones esperadas de neuronas dopaminérgicas del ARC y del AVT/SN, aunque son necesarios más experimentos para determinar con exactitud la bondad de la recombinación los animales  $Dat^{cre/+}$ - $Ghsr^{n/n}$ .

Además de los modelos de ratones modificados genéticamente utilizados en el presente trabajo, una de las técnicas que más empleamos en el laboratorio para determinar la activación de una población neuronal es la inmuno-tinción contra c-Fos. Como se indicó en la Introducción, c-Fos es un factor de transcripción que pertenece a la familia de genes de activación temprana y la presencia de c-Fos en una célula se interpreta como señal de activación transcripcional. Otro marcador de activación transcripcional que usamos en este trabajo de Tesis es pERK, que se encuentra en la cascada de señalización activada por unión de la ghrelina al GHSR y fosforila factores de transcripción que, finalmente, producen la transcripción de c-Fos (Camiña et al., 2007; Roskoski, 2012). Sin embargo, utilizamos la inmuno-tinción contra pERK para determinar la acción directa de la ghrelina sólo en el caso del complejo dorsal del vago, ya que la detección de esta proteína por inmuno-tinción no resulta tan sencilla como la de c-Fos y el tiempo al cual se produce el máximo en los niveles de proteína de pERK es distinto al de c-Fos. En contraposición, c-Fos ha sido y es ampliamente utilizado como marcador de activación neuronal debido a que es una proteína que puede ser fácilmente detectada, gracias a la disponibilidad de una gran cantidad de anticuerpos específicos, a que su detección por inmuno-tinción puede ser combinada con otras tinciones, y a que se detectan bajos niveles de la proteína en cerebros intactos. Como también se indicó en la Introducción de este trabajo, la detección de c-Fos en una neurona no implica, estrictamente, más que una activación transcripcional, por lo que no puede concluirse que esa neurona se haya activado eléctricamente o haya liberado neurotransmisor. A pesar de ello, en la literatura es ampliamente aceptado que si en una población neuronal aumenta el número de neuronas que expresa c-Fos en respuesta a un estímulo determinado, entonces dicha población participa en la respuesta a tal estímulo (Kovács, 2008). Por otro lado, el hecho de que no haya cambios en los niveles de c-Fos debe interpretarse con cuidado, ya que puede que las neuronas generen respuestas que no implican cambios en la actividad transcripcional, como, por ejemplo, generación de potenciales de acción. Otro aspecto importante del empleo de c-Fos como marcador de activación neuronal es la cinética que presenta la expresión de este factor de transcripción. El ARNm de c-Fos presenta un pico máximo aproximadamente a los 30 minutos pos-estímulo, mientras que los niveles de proteína son máximos aproximadamente a las 2 horas pos-estímulo (Kovács, 1998). Así, es importante que el sacrificio de los animales experimentales respete los tiempos en que se detectan los niveles máximos del marcador. De lo contrario, la variabilidad entre los niveles de cada animal podría enmascarar algún efecto del estímulo realizado. En nuestro caso, todos los animales cuyos cerebros se sometieron a la inmuno-tinción contra c-Fos se sacrificaron a las 2 horas pos-estímulo para poder detectar el pico máximo en los niveles de la proteína de c-Fos (Kovács, 2008). Un último aspecto a tener en cuenta es que c-Fos es un marcador de activación que responde a diversos estímulos, entre ellos, el estrés (Figueiredo et al., 2003). Así, los animales deben ser entrenados previo a la realización de las maniobras experimentales para evitar que los cambios en los niveles de c-Fos causados por el estímulo experimental sean enmascarados por el estrés de los animales al enfrentar las condiciones experimentales.

Con respecto al protocolo de atracón utilizado en este trabajo de Tesis, el mismo fue puesto a punto y caracterizado por nuestro laboratorio en estudios anteriores (Valdivia et al., 2014, 2015). De acuerdo a nuestros resultados, la exposición de los ratones durante 2 horas por cuatro días consecutivos a un pellet de DACG

provoca una hiperfagia que muestra un perfil ascendente en la ingesta a lo largo de los días. Por otro lado, se registran diferencias en la ingesta de DACG cuando se compara a los ratones  $Ghsr^{n/n}$  con animales WT. Además, los ratones WT expuestos a la DACG de forma limitada e intermitente presentan un aumento en el número de neuronas que expresa c-Fos en los núcleos cerebrales del circuito mesolímbico, aumento que no se evidencia en los ratones  $Ghsr^{n/n}$  (Valdivia et al., 2015). Estos resultados indican que el sistema de ghrelina y GHSR tiene implicancias en el fenotipo de ingesta y de activación del circuito mesolímbico que se observa en ratones expuestos al protocolo de atracón. En este trabajo de Tesis, el protocolo de atracón fue empleado como un modelo experimental tanto para estudiar el efecto que tiene la expresión selectiva del GHSR en neuronas dopaminérgicas sobre la ingesta de DACG como el efecto que tiene la ingesta de DACG sobre las neuronas que expresan GHSR del NTS y también para estudiar la ingesta de DACG de ratones WT cuando se modula la actividad del GHSR. En el caso del circuito mesolímbico, se empleó el protocolo de atracón debido a que se sabe que tanto el AVT como el NAc se activan frente a la ingesta de DACG. En el caso del complejo dorsal del vago, el protocolo de atracón se empleó con dos objetivos: uno fue estudiar si las neuronas eGFP+ del NTS responden frente a la distensión gástrica causada por el consumo de DACG, ya que sabíamos que una población de neuronas del NTS caudal recibe aferencias vagales y está involucrada en el control del vaciado gástrico; el otro objetivo fue estudiar si las neuronas eGFP+ del NTS responden al consumo de una dieta con características de gusto y palatabilidad distintas a la dieta estándar, ya que también sabíamos que una población de neuronas del NTS rostral está inervada por nervios gustatorios provenientes de la cavidad oral. Así, el protocolo de atracón resultó una herramienta útil tanto por el hecho de involucrar la participación de circuitos neuronales relacionados a la recompensa que causa la ingesta de dietas apetecibles, así como también sistemas relacionados al control de la ingesta directamente a través de la modulación del tracto gastrointestinal. Los resultados obtenidos empleando el protocolo de atracón en cada caso particular se discutirán en las siguientes secciones.

## **Rol modulador de la ghrelina y el GHSR sobre las neuronas del complejo dorsal del vago**

Como se mencionó previamente, los núcleos cerebrales que componen al complejo dorsal del vago se encuentran relacionados al control de funciones del sistema nervioso autónomo incluyendo a las distintas funciones del tracto gastrointestinal. En particular, las neuronas que componen el NTS se encuentran organizadas a lo largo del eje rostro-caudal de acuerdo a su función: las neuronas del NTS rostral reciben, principalmente, inervaciones gustatorias y orotáctiles, mientras que las neuronas del NTS caudal reciben inervaciones cardiovasculares, viscerales y respiratorias (King, 2007). Las neuronas del NTS integran estas vías aferentes para luego regular distintas respuestas orofaciales, autonómicas, neuroendócrinas y comportamentales a través de proyecciones que el NTS envía a otros núcleos cerebrales (Rinaman, 2010). De estudios anteriores, sabíamos que algunas neuronas del NTS expresan el GHSR y que la acción de la ghrelina sobre este núcleo induce algunos efectos. Por ejemplo, la administración de ghrelina directamente en el cuarto ventrículo cerebral o directamente en el complejo dorsal del vago induce contracciones gástricas vía eferencias vagales colinérgicas y aumenta la ingesta de alimento (Faulconbridge et al., 2003, 2008; Swartz et al., 2014).



En la misma dirección, la administración intra-NTS de ghrelina disminuye tanto la actividad simpática como la presión arterial de ratas (Lin Yingzi et al., 2004). Además, estudios por modelado 3D muestran que las neuronas del NTS presentan distintos patrones de actividad dependiendo del estímulo, lo que sugiere una segregación funcional de las neuronas a lo largo del NTS (Schwarz et al., 2010). En este trabajo de Tesis, decidimos estudiar la distribución neuroanatómica de las neuronas que expresan GHSR del NTS y su potencial segregación en diferentes grupos de neuronas porque esta información podría revelar una posible función de las mismas que no se conocía hasta el momento.

Para el estudio del complejo dorsal del vago empleamos el modelo de ratón  $Ghsr^{eGFP}$ , ya que sabíamos que estos ratones tienen una buena expresión de eGFP en el AP (Mani et al., 2014). Sin embargo, de acuerdo al estudio de Mani et al. 2014 en el que se caracteriza al modelo  $Ghsr^{eGFP}$ , sólo el ~50% de las neuronas eGFP+ también presentan señal para el ARNm del GHSR. En este trabajo de Tesis, realizamos un análisis exhaustivo de distintas técnicas que ponen de manifiesto la presencia del GHSR: ISHH del *Allen Mouse Brain Atlas*, fluorescencia endógena de eGFP en cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$ , inmuno-tinción contra eGFP en cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$  e inmuno-tinción contra fluoresceína en cerebros de ratones WT inyectados por vía ICV con F-ghrelina. El análisis de la ISHH indicó la existencia de ~2100 neuronas que expresan GHSR en el NTS; en el caso de los análisis realizados con muestras de cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$ , el análisis de la fluorescencia endógena de eGFP indicó que el NTS contiene ~1400 neuronas que expresan GHSR, mientras que la inmuno-tinción mostró la presencia de ~1800 neuronas eGFP+ en el NTS, un valor cercano al obtenido al analizar la ISHH del *Allen Mouse Brain Atlas*. El mayor número encontrado en el análisis de la inmuno-tinción anti-eGFP respecto de la fluorescencia endógena fue esperado, ya que la inmuno-detección cromogénica incluye un paso de amplificación enzimática y, además, la detección de células fluorescentes por observación directa puede verse afectada por la autofluorescencia verde del tejido. De acuerdo a los valores obtenidos de la ISHH y de los cortes de cerebros de ratones  $Ghsr^{eGFP}$ , la mayoría de las neuronas eGFP+ del NTS deberían expresar el GHSR, mientras que una pequeña fracción correspondería a células que no expresan el receptor. Desconocemos la razón por la cual el estudio de Mani et al. 2014 muestra que sólo el ~50% de las neuronas eGFP expresa el ARNm del GHSR, aunque podríamos sugerir que el precipitado de DAB de la inmuno-tinción anti-eGFP haya afectado el depósito de plata de la ISHH, haciendo que el mismo se disperse y dificulte la identificación de neuronas que expresan el ARNm del GHSR. Finalmente, el número de células GHSR identificadas mediante la inmuno-tinción anti-fluoresceína fue mayor al detectado por el resto de las técnicas, con un valor total de ~3300 células fluoresceína+. Esto puede deberse a que la inmuno-detección de fluoresceína tiene mayor señal de fondo, lo cual fue evidente en las regiones cercanas al cuarto ventrículo cerebral debido a la difusión del trazador. Por otro lado, no puede descartarse la presencia de otras proteínas, distintas del GHSR, que unan ghrelina (Callaghan and Furness, 2014). Un aspecto importante es que todos los métodos analizados mostraron que la mayoría de las neuronas que expresan GHSR del NTS se concentran en la parte caudal del núcleo, alrededor de Bregma -7,50 mm. De acuerdo a los análisis que realizamos, creemos que el modelo de ratón  $Ghsr^{eGFP}$  es una herramienta útil para estudiar el sistema de ghrelina y GHSR en el NTS ya que permite la identificación de las neuronas GHSR de un modo sencillo y reproducible, además

de permitir analizar la citoarquitectura de las células que expresan el receptor, la cual sugiere que la mayoría de dichas células son de naturaleza neuronal.

A continuación, realizamos un análisis de agrupamiento de las neuronas eGFP+ del NTS y este análisis indicó la existencia de un par de grupos de neuronas que expresan el GHSR localizados en la parte rostral del NTS y con simetría respecto del eje antero-posterior. Estos grupos de neuronas que expresan el GHSR de la región rostral del NTS resultaron ser sensibles a cambios rápidos y espontáneos en la ingesta inducidos por ayuno previo o por un atracón con DACG. Las neuronas que expresan el GHSR de la región rostral del NTS se localizan principalmente en el sub-núcleo rostro-central, que recibe aferencias gustatorias de los nervios craneales que inervan la cavidad oral (King, 2007). Al mismo tiempo, encontramos un grupo de neuronas que expresan el GHSR localizado en la parte caudal del NTS que se activan frente a la distensión gástrica, un estímulo mecánico que activa los mecanorreceptores vagales, o por la administración del agente nauseogénico LiCl, que es un estresor interoceptivo (Curtis et al., 1994; Traub et al., 1996). Ambas maniobras experimentales suprimen la ingesta vía activación de las neuronas productoras de GLP-1 del NTS (Rinaman, 1999; Vrang et al., 2003). Así, parecería que las neuronas del NTS rostral que expresan el GHSR están asociadas a comportamientos relacionados a la ingesta mientras que las neuronas del NTS caudal que expresan el GHSR podrían ser parte de un circuito neuronal que integra inervaciones sensoriales gastrointestinales que finalmente modulan la ingesta de alimento.

Por otro lado, el NTS también contiene neuronas sensibles a glucosa, que regulan la alimentación y la homeostasis de glucosa, y un sub-set de estas neuronas es GABA (Boychuk et al., 2015; Ritter et al., 2000). En los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, no observamos la inducción de c-Fos en las neuronas eGFP del NTS de ratones expuestos a hipo- o hiperglucemia aguda, lo que no implica necesariamente que las neuronas que expresan el GHSR del NTS no respondan a cambios en la glucemia. También, podría proponerse que la glucosa regula eventos neuronales rápidos (como la actividad eléctrica) independientemente de la transcripción génica (Boychuk et al., 2015). En estudios previos también se ha demostrado que ratones con expresión del GHSR limitada al rombencéfalo (en neuronas que expresan Phox2b) cuando son ayunados por 48 horas, muestran una hipoglucemia similar a la de animales WT y distinta de la de animales deficientes en el receptor de ghrelina, sugiriendo que la señalización del GHSR en el rombencéfalo regula la homeostasis de glucosa (Scott et al., 2012). Las neuronas que expresan el GHSR del rombencéfalo incluyen no sólo a las presentes en el NTS sino también a las del AP, el núcleo ambiguo y el núcleo motor facial (Scott et al., 2012). Así, se necesitarían más estudios para determinar qué rol cumplen las neuronas que expresan el GHSR en los distintos núcleos cerebrales del rombencéfalo regulando la homeostasis de glucosa.

La capacidad de los núcleos que componen el complejo dorsal del vago de mediar las acciones orexigénicas de la ghrelina es un punto muy discutido en la literatura. Los estudios iniciales muestran que tratamientos como la vagotomía o la capsaicina, que lesiona las aferencias mielinizadas y las aferencias no-vagales, suprimen el efecto orexigénico de la ghrelina en ratas (Asakawa et al., 2001; Date et al., 2002). Sin embargo, estudios más

recientes en los que se emplearon deafferenciaciones subdiafragmáticas completas mostraron que no se requieren las aferencias vagales para la ghrelina sea capaz de regular la ingesta (Arnold et al., 2006). Nuestros resultados muestran que los ratones con el AP ablacionada aumentan el consumo de alimento cuando son administrados por vía subcutánea con ghrelina. Esta observación está de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio que indican que los efectos orexigénicos de la hormona administrada periféricamente requieren que el ARC se encuentre intacto (Cabral et al., 2014). También es interesante mencionar que se ha reportado que ratas con el AP ablacionada muestran una ingesta acumulada disminuida luego del sexto día de tratamiento con ghrelina (Gilg and Lutz, 2006). El hecho de que las ratas con el AP ablacionada muestren una respuesta normal a la ghrelina durante los primeros días de tratamiento junto a nuestra observación de que los ratones con el AP ablacionada tienen un vaciado gástrico disminuido, sugieren que el rol del AP como mediadora del efecto de ghrelina en la ingesta acumulada podría ser un efecto secundario al de la motilidad gástrica reducida, que podría impactar sobre el tamaño de las porciones ingeridas. Finalmente, es importante destacar que nuestros resultados no descartan la posibilidad de que las neuronas del NTS que expresan el GHSR regulen la ingesta, lo que iría de acuerdo con estudios que muestran que la administración intra-complejo dorsal del vago de ghrelina aumenta el consumo de alimento (Faulconbridge et al., 2003).

Con respecto al fenotipo de las neuronas que expresan GHSR del NTS, en estudios previos se ha mostrado que estas neuronas no producen CCK (Zigman et al., 2006). Además, se ha mostrado que la ghrelina actúa sobre las neuronas catecolaminérgicas del NTS a través de una vía indirecta que involucra la inhibición de la liberación presináptica de glutamato (Cui et al., 2011). Nuestros resultados no sólo confirman que las neuronas que expresan el GHSR del NTS no son catecolaminérgicas, sino también que las neuronas eGFP no sintetizan acetilcolina, Met-enkefalina, NPY o TRH. Además, nuestros resultados indicaron que el ~30% de las neuronas que expresan GHSR del NTS son GABA y están concentradas en el sub-núcleo parvicelular del NTS caudal. Este sub-núcleo pertenece a una región del NTS que responde a la distensión gástrica y un sub-set de neuronas del sub-núcleo parvicelular es conocido por inervar el núcleo parabraquial lateral, que regula la ingesta de alimento (Ganchrow et al., 2013; Whitehead, 1990; Wu et al., 2012). Por otro lado, las características citoarquitectónicas de las neuronas eGFP del NTS son parecidas a las previamente descritas neuronas “ovoides” del NTS rostral, que representan el set de interneuronas GABA más abundantes dentro de este núcleo (King and Bradley, 1994). Estas interneuronas GABA inhiben la transmisión excitatoria desde las aferencias del tracto solitario a las neuronas del NTS (Chen et al., 2016; Fawley et al., 2011; McDougall and Andresen, 2012). Además, algunas neuronas GABA del NTS inervan el complejo motor dorsal del vago y modulan la actividad motora vagal (Davis et al., 2004; Gao et al., 2009). Nuestros resultados muestran que sólo una fracción de las neuronas GABA del NTS expresa el GHSR. Entonces, es posible que la señalización de ghrelina tenga como blanco a un sub-grupo de neuronas GABA del NTS que, a su vez, regula otras neuronas que controlan las funciones mediadas por el complejo dorsal del vago. A pesar de los estudios que hemos realizado, la identidad de la mayoría de las neuronas que expresan el GHSR del NTS todavía debe determinarse. Algunas posibles vías de señalización que podrían ser blanco de ghrelina en el NTS podrían ser neuronas productoras de GABA que no expresan Gad2, o neuronas que producen glutamato, glicina,

somatostatina, GLP-1, nesfatina-1 o galanina, entre otras (Coelho et al., 2004; Goebel-Stengel et al., 2011; Shi et al., 2017). Serán necesarios más estudios para establecer el fenotipo y las funciones de todas las neuronas que expresan el GHSR del NTS.

En cuanto a las neuronas que expresan el GHSR del AP, nuestros resultados indicaron que el ~70% de estas neuronas son también neuronas GABA, mientras que sólo un ~30% de las neuronas GABA del AP expresa el GHSR. Nuestros resultados también mostraron que alrededor del 10% de las neuronas GABA del AP aumentan los niveles de c-Fos en respuesta a la administración ghrelina; como no detectamos diferencias en los niveles de c-Fos en las neuronas del AP que no expresan el GHSR cuando se trata a los animales *Ghsr<sup>eGFP</sup>* con ghrelina, inferimos que la hormona activa aproximadamente a la mitad de todas las neuronas GABA del AP que expresan el GHSR. Estudios previos han mostrado que la ghrelina hiperpolariza aproximadamente a la mitad de las neuronas del AP sensibles a la hormona y despolariza a la otra mitad (Fry and Ferguson, 2009), lo cual está de acuerdo a los resultados que nosotros obtuvimos. Sin embargo, las implicancias fisiológicas de este rol diferencial de la ghrelina sobre las distintas poblaciones de neuronas GABA del AP aún se desconocen. Nuestros resultados mostraron también que las neuronas TH del AP no expresan GHSR ni responden con aumentos de c-Fos a la administración periférica de ghrelina, indicando que el sistema catecolaminérgico del AP no es blanco de la hormona en ratones.

De acuerdo a mediciones realizadas en trabajos previos, la administración periférica de ghrelina en nuestras condiciones experimentales produce un aumento agudo de la concentración en plasma de la hormona, con un pico máximo a los pocos minutos de la inyección que luego decae hasta alcanzar los niveles basales a los 60 minutos pos-inyección (Goldstein et al., 2011). El pico transitorio de ghrelina a los 30 minutos pos-inyección representa un aumento de 10 veces respecto de los niveles basales (Cabral et al., 2014; Chuang et al., 2011). Un aumento de 10 veces en los niveles plasmáticos de ghrelina es comparable con el aumento encontrado en ratones con restricción calórica crónica (Zhao et al., 2014). Para estudiar la capacidad de respuesta de las neuronas del AP a aumentos endógenos de ghrelina, examinamos la inducción de c-Fos en ratones ayunados por 48 horas, los cuales presentan un aumento de aproximadamente 2 veces en los niveles de ghrelina plasmática. Al ayunar animales *Ghsr<sup>eGFP</sup>*, encontramos que tanto las neuronas del AP que expresan GHSR como las que no lo hacen aumentan c-Fos en respuesta a un ayuno de 48 horas. El aumento de c-Fos en neuronas del AP que no expresan el GHSR era esperado, ya que esta región del complejo dorsal del vago también contiene neuronas capaces de responder a factores metabólicos y hormonas (glucosa, insulina, leptina, CCK, entre otras), que también cambian sus concentraciones plasmáticas durante el ayuno (Price et al., 2008). La observación de que el ayuno de 48 horas sólo aumenta c-Fos en las neuronas del NTS que no expresan el GHSR va de la mano con la idea de que las células que expresan el GHSR del NTS no son sensibles a la ghrelina circulante. Está descripto que el ayuno disminuye el consumo de agua que podría, a su vez, inducir una activación del AP por deshidratación (Ellacott et al., 2010; Price et al., 2008). Sin embargo, el aumento en los niveles c-Fos que detectamos en el AP no se vio modificado al realizar fluidoterapia durante el

ayuno de los ratones, sugiriendo que la activación del AP no se relaciona con cambios en el balance hídrico corporal.

Una característica importante del AP es que es una de las regiones más vascularizadas del cerebro (McKinley et al., 2003); como este suministro vascular carece de una barrera hemato-encefálica, las células del AP se encuentran constantemente expuestas a moléculas circulantes, incluida la ghrelina (Price et al., 2008). Las neuronas del AP presentan niveles de expresión del GHSR altos y la administración de ghrelina aumenta tanto los niveles de c-Fos como la actividad eléctrica de algunas neuronas del AP (Cabral et al., 2014; Fry and Ferguson, 2009; Zigman et al., 2006). Así, era esperado que la F-ghrelina administrada periféricamente acceda y aumente la señal de pERK en el AP. Al mismo tiempo, nuestros estudios utilizando ratones *Ghsr<sup>eGFP</sup>* mostraron que la administración periférica de ghrelina aumenta los niveles de c-Fos exclusivamente en las neuronas que expresan el GHSR del AP que, a su vez, envían proyecciones a otras áreas del cerebro. En contraposición, la F-ghrelina administrada periféricamente no accede ni aumenta el nivel de señal de pERK en el NTS (Cabral et al., 2014; Fry and Ferguson, 2009; Zigman et al., 2006). Sin embargo, la ghrelina administrada periféricamente aumenta el nivel de c-Fos en células del NTS que no expresan el GHSR. Así, nuestros datos sugieren que el AP es el componente del complejo dorsal del vago sensible a cambios en la concentración de ghrelina plasmática, mientras que el NTS no es alcanzado directamente por la hormona. Esto probablemente se deba a la presencia del *funiculus separans*, que es una capa de células que funciona como barrera, separando el AP del tejido cerebral subyacente (Price et al., 2008). Además, observamos que las neuronas eGFP del AP envían proyecciones ventro-laterales en el plano coronal hacia el NTS, y, en trabajos previos se ha demostrado que el AP inerva fuertemente al NTS (Price et al., 2008). De tal manera, inferimos que las neuronas del AP capaces de detectar cambios en la concentración de ghrelina circulante y de modificar la actividad de las neuronas del NTS a través de la inervación que existe entre ambos núcleos.

Muchos estudios han mostrado que la ghrelina aumenta el vaciado gástrico. En ratones, un antagonista del receptor de ghrelina reduce el vaciado gástrico (Asakawa et al., 2001) mientras que la ghrelina estimula el vaciado gástrico sin tener efectos sobre la secreción de ácido gástrico o sobre las células endócrinas del estómago (Dornonville de la Cour et al., 2004; Winter et al., 2004). Al mismo tiempo, ratones deficientes en el GHSR muestran un vaciado gástrico más lento (Yang et al., 2013) y ratones ayunados muestran un aumento en el vaciado gástrico (Roda et al., 2010). El vaciado gástrico está controlado por la vía del reflejo vago-vagal, que involucra tres grupos de neuronas: las neuronas aferentes vagales del ganglio nodoso que transmiten la información sensorial desde el tracto gastrointestinal al NTS, las neuronas sensoriales viscerales del NTS caudal y las neuronas colinérgicas motoras del complejo motor dorsal del vago. Las neuronas sensoriales del AP pueden modular la actividad del reflejo vago-vagal (Price et al., 2008). Nuestros estudios indicaron que la inducción del vaciado gástrico por la administración periférica de ghrelina requiere la presencia del AP intacta. Además, se encuentra claramente establecido que las neuronas del AP proveen un suministro importante de GABA a las neuronas del NTS, que regula el circuito vago-vagal (Kachidian and Pickel, 1993; Maley et al., 1987; Price et al., 2008). Nuestros resultados muestran que las neuronas del AP que expresan el GHSR son

GABA y envían proyecciones ventro-laterales hacia el NTS. Así, podría proponerse que las neuronas GABA sensibles a ghrelina del AP regulan el vaciado gástrico a través de la modulación de la actividad de las neuronas del NTS que son parte del reflejo vago-vagal. En concordancia con esta hipótesis, un estudio previo muestra que la administración periférica de ghrelina no aumenta c-Fos en el NTS de ratas con el AP ablacionada (Li et al., 2006). De todas maneras, la activación de las neuronas GABA del AP provocaría una inhibición de las neuronas corriente abajo por lo que se necesitan futuros estudios para entender los circuitos por los que la ghrelina es capaz de activar a neuronas del NTS que no expresan el GHSR.

De acuerdo a los resultados discutidos en el párrafo anterior, la ghrelina circulante requiere de la integridad del AP para aumentar el vaciado gástrico. De todas formas, no podemos descartar que este efecto se deba a la acción simultánea de la hormona sobre diferentes blancos. Se ha mostrado, en ratas, que el GHSR es expresado por las neuronas presentes en el ganglio nodoso que inervan el estómago (Sakata et al., 2003). Además, se ha demostrado en ratones y hurones que la ghrelina inhibe las respuestas vagales aferentes a la tensión en preparados gastro-esofágicos *ex vivo* (Page et al., 2007). Así, la ghrelina sería capaz de inducir el vaciado gástrico vía inhibición de las aferencias vagales y reducción de las inervaciones inhibitorias en la función motora gástrica (Page et al., 2007). En ratas, también se ha mostrado que la ghrelina podría regular la motilidad gastrointestinal independientemente del reflejo vago-vagal, ya que la administración periférica de ghrelina a animales vagotomizados aumenta las contracciones del antro (Fujino et al., 2003) y los antagonistas colinérgicos sólo reducen parcialmente el efecto de la ghrelina en la actividad mioeléctrica gástrica y el vaciado gástrico (Tümer et al., 2008). Además, la administración de ghrelina directamente sobre el complejo dorsal del vago de ratas produce contracciones en el corpus gástrico a través de la vía eferente colinérgica del complejo motor dorsal del vago (Swartz et al., 2014). Así, no descartamos la posibilidad de que la ghrelina regule la función gástrica por efectos a nivel periférico, pero nuestros resultados, así como resultados de otros estudios, también indican que la ghrelina es capaz de modular las funciones del tracto gastrointestinal a través de su acción sobre los núcleos del complejo dorsal del vago.

## **Rol modulador de la ghrelina y el GHSR sobre las neuronas del circuito mesolímbico**

En cuanto a los resultados obtenidos cuando estudiamos el circuito mesolímbico, partimos de saber que el mismo conecta el AVT y el NAcb y regula procesos cognitivos entre los que se incluye la saliencia de un incentivo, la motivación, el aprendizaje por refuerzo y los comportamientos tendientes a la obtención de objetivos. El AVT está subdividido en diferentes sub-núcleos que inervan preferencialmente y activan las distintas subdivisiones del NAcb que, a su vez, pueden regular distintos comportamientos. Se sabe que el circuito mesolímbico es blanco de la ghrelina y que el mismo modula aspectos relacionados a la ingesta de alimentos cuyo consumo se percibe como una recompensa (Perello and Dickson, 2015). De todas formas, los componentes específicos del circuito AVT-NAcb que son regulados por la ghrelina no se conocían con claridad y es por eso que decidimos estudiarlos. En particular, analizamos la distribución de las neuronas que unen F-ghrelina en el AVT y la distribución de las neuronas que expresan c-Fos en respuesta a la ghrelina tanto en el AVT como en el NAcb. Los resultados obtenidos luego de la administración central de F-ghrelina, así como el

análisis de las imágenes de ISHH del *Allen Mouse Brain Atlas* confirmaron que las neuronas del AVT de ratón expresan el GHSR, mientras que el NAcB no presenta neuronas que expresen el GHSR. Estos resultados son congruentes con lo que ya se ha publicado en estudios previos que emplean ISHH, PCR tiempo real, ensayos de pegado de ghrelina o modelos de ratones modificados genéticamente en los que las neuronas que expresan GHSR son marcadas fluorescentemente (Cabral et al., 2013; Chuang et al., 2011; Mani et al., 2014, 2017; Perello M et al., 2012; Zigman et al., 2006). Así, el blanco de la acción de la ghrelina en el circuito mesolímbico serían las neuronas del AVT. Al mismo tiempo, los resultados mostraron que la mayor parte de las neuronas que unen F-ghrelina se encuentran en el IF y que la inyección ICV de ghrelina aumenta el número de neuronas que expresa c-Fos en el IF y en el NAcBShM. Por ende, la ghrelina regularía principalmente procesos asociados a experiencias recompensantes, ya que el NAcBShM se relaciona principalmente al procesamiento de estas experiencias. Los resultados también indicaron que existen neuronas que unen F-ghrelina en el PN y en el PBP y que la administración ICV de ghrelina también aumenta el número de neuronas que expresa c-Fos en estos sub-núcleos del AVT. Además, la inyección de ghrelina ICV en ausencia de comida aumenta el número de neuronas que expresa c-Fos en el NAcBC. Así, la acción de ghrelina sobre el AVT también podría afectar funciones motoras tendientes a la obtención de alimentos.

En concordancia con la idea de que la ghrelina actúa sobre las neuronas del AVT para estimular la actividad locomotora en pos de la obtención de alimentos, nuestros resultados mostraron que la administración ICV de ghrelina aumenta la actividad locomotora de los ratones. Aquí no se puede descartar el efecto de la ghrelina sobre las neuronas que expresan el GHSR de la SNpc, ya que las mismas se encuentran en una región muy cercana a las del AVT y esta región del cerebro es responsable de la regulación de los movimientos voluntarios. En este sentido, se ha mostrado que tanto la activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del AVT como la de las neuronas dopaminérgicas de la SN en ratas aumenta la actividad locomotora (Boekhoudt et al., 2016). Sin embargo, el aumento en la distancia recorrida que se obtiene cuando se activan las neuronas dopaminérgicas del AVT es mucho mayor que el observado al activar las neuronas dopaminérgicas de la SN, lo que indicaría que la población neuronal dopaminérgica del AVT tiene mayor relevancia en el desarrollo de la actividad locomotora. Por otro lado, también cabe la posibilidad de que la ghrelina actúe directamente sobre las terminales dopaminérgicas que inervan a las neuronas del NAcB. Estudios previos han reportado que la inyección de ghrelina intra-NAcB aumenta la ingesta de manteca de maní en ratones (Prieto-García et al., 2015) y también que la ghrelina puede actuar a nivel presináptico en poblaciones neuronales, por ejemplo en las neuronas hipofisiotróficas productoras de CRH del NPV (Cabral et al., 2012, 2016). De esta manera, es posible que la ghrelina active localmente a las neuronas del NAcB actuando a través del GHSR presente en las terminales presinápticas que las inervan.

Las neuronas dopaminérgicas representan la población mayoritaria en el AVT, seguidas por las neuronas GABA. En nuestros estudios encontramos que sólo un grupo de neuronas dopaminérgicas del PBP aumenta la expresión de c-Fos en respuesta a la administración ICV de ghrelina, mientras que las neuronas dopaminérgicas del IF y del PN no aumentan c-Fos en las mismas condiciones experimentales. Estudios

previos muestran que las neuronas dopaminérgicas del AVT expresan el GHSR y aumentan la frecuencia de potenciales de acción en respuesta a la ghrelina (Abizaid et al., 2006; Zigman et al., 2006). Además, la administración intra-AVT de ghrelina induce un aumento en la liberación de dopamina en el NAcB de roedores (Jerlhag et al., 2006; Kawahara et al., 2009). Además, la fracción de neuronas dopaminérgicas del PBP que aumenta los niveles de c-Fos en respuesta a ghrelina es relativamente baja; así, es posible que el efecto de la ghrelina sobre las neuronas dopaminérgicas sea preferencialmente a través de la modulación de la actividad eléctrica o la liberación de neurotransmisor independientemente de la transcripción génica de c-Fos (Hoffman et al., 1994). De acuerdo con esta hipótesis, se han publicado algunos estudios que muestran que la activación del circuito mesolímbico puede inducir aumentos robustos dependientes de dopamina en los niveles de c-Fos en las regiones estriatales sin provocar un cambio significativo en los niveles de c-Fos de las neuronas dopaminérgicas del AVT (Hunt and McGregor, 1998; Kiba and Jayaraman, 1994).

Nuestros resultados también indicaron que neuronas no dopaminérgicas del AVT aumentan los niveles de c-Fos en respuesta a la administración ICV de ghrelina. El empleo de los ratones *Gad2<sup>cre/+</sup>-Rosa26<sup>tdTomato</sup>* nos permitió determinar que la ghrelina aumenta los niveles de c-Fos en una sub-población de neuronas GABA del IF. Estudios previos muestran que las neuronas GABA del AVT también expresan el GHSR y que la ghrelina activa a las neuronas dopaminérgicas del AVT, en parte, vía inhibición del tono local de GABA (Abizaid et al., 2006). Las neuronas GABA del AVT incluyen tanto interneuronas que regulan los circuitos neuronales intra-AVT, así como neuronas GABA que proyectan y regulan otros núcleos blancos del AVT (Morales and Margolis, 2017; Yetnikoff et al., 2014). Se necesitarán más estudios para poder discernir el rol de las neuronas GABA del AVT sensibles a la ghrelina. En estudios previos de nuestro laboratorio se ha mostrado que hay grupos de neuronas GABA que expresan el GHSR y que median acciones específicas de la hormona (Cabral et al., 2016), así como también se ha mostrado en este trabajo de Tesis que las neuronas GABA del AP mediarían el vaciado gástrico inducido por ghrelina. Así, las neuronas GABA parecen representar una población neuronal clave a través de la cual la ghrelina regula diferentes funciones en distintos núcleos cerebrales.

Respecto de la capacidad de la ghrelina periférica de impactar en el circuito mesolímbico, nuestros resultados mostraron que la ghrelina inyectada por vía subcutánea aumenta el consumo de alimento de los ratones, pero no aumenta el número de células que expresa c-Fos en el AVT ni afecta la actividad locomotora de los animales. Estas observaciones concuerdan con trabajos publicados por nuestro laboratorio que muestran que la F-ghrelina administrada por vía subcutánea no alcanza el AVT (Cabral et al., 2014). En contraposición, algunos estudios previos muestran que la inyección sistémica de ghrelina aumenta la actividad locomotora de los ratones (Disse et al., 2011; Jerlhag, 2008; Jerlhag et al., 2010). Además, se ha mostrado la ghrelina administrada sistémicamente afecta otros comportamientos relacionados con el circuito mesolímbico como la preferencia por un lugar asociado a dietas apetecibles, la ingesta de dietas apetecibles y la liberación de dopamina en el NAcB (Denis et al., 2015; Disse et al., 2011; Jerlhag, 2008; Jerlhag et al., 2010; Lockie et al., 2015; Perello et al., 2010). De todas formas, estos estudios emplearon dosis mayores de ghrelina que, en algunos casos, se inyectaron por vía intraperitoneal, vía que tiene una tasa de absorción inicial mayor comparada con la vía subcutánea (Hedrich and Bullock, 2004). Dado que la cantidad de ghrelina que tiene



acceso al cerebro depende de la concentración plasmática (Cabral et al., 2014), resulta razonable pensar que las maniobras experimentales que producen niveles plasmáticos de ghrelina muy altos pueden desenmascarar efectos de la hormona que dependen de su acción en regiones más profundas del cerebro. Vale mencionar que la ghrelina no es producida en el cerebro (Cabral et al., 2017b); así, la relevancia de la presencia del GHSR en áreas en las que la ghrelina no tiene acceso directo, como el AVT, es incierta. El GHSR muestra una elevada actividad constitutiva en ausencia de ghrelina (Holst et al., 2003) y es capaz de heterodimerizar con otros receptores acoplados a proteínas G para modular su señalización (Schellekens et al., 2015; Wellman and Abizaid, 2015). Entonces, la actividad constitutiva del GHSR y/o las interacciones con otros receptores en el AVT podrían también tener un impacto en la actividad de las neuronas del circuito mesolímbico bajo ciertas condiciones, condiciones que aún deben ser determinadas.

## **Implicancias de la presencia del GHSR exclusivamente las neuronas dopaminérgicas**

Las neuronas dopaminérgicas son objeto de múltiples estudios ya que desempeñan funciones importantes de acuerdo a su localización en el cerebro. Las neuronas dopaminérgicas presentes en el ARC se asocian a la regulación del eje de prolactina, inhibiendo la síntesis y liberación de la misma por liberación de dopamina en la hipófisis anterior (Saleem et al., 2018). Las neuronas dopaminérgicas del circuito mesolímbico se asocian al procesamiento de experiencias recompensantes, entre ellas, el consumo de dietas apetecibles. La liberación de dopamina en el NAc por parte de las neuronas dopaminérgicas del AVT codifica el valor de recompensa de un estímulo dado (Schultz, 2013), y se relaciona a la actividad de estas neuronas con la regulación del esfuerzo que un organismo realizará para obtener un estímulo placentero (Meye and Adan, 2014). Las neuronas dopaminérgicas de la SN, en particular las de la SNpc, forman parte del denominado circuito nigroestriatal involucrado en la regulación de los movimientos voluntarios y ampliamente estudiadas por su relación con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Stievenard et al., 2017). Las neuronas dopaminérgicas, al igual que muchas otras poblaciones neuronales, se han estudiado empleando la tecnología Cre/LoxP. En los primeros estudios, se utilizaron modelos de animales modificados genéticamente que expresan la recombinasa Cre bajo el control del gen de TH, enzima limitante en la producción de dopamina y utilizada como estándar de oro en la identificación de neuronas dopaminérgicas (Gelman et al., 2003; Ungless and Grace, 2012). Sin embargo, se han reportado inconsistencias en las líneas que utilizan TH como gen conductor de la expresión de la recombinasa Cre, con expresión de la enzima en neuronas que no muestran señal inmuno-reactiva para TH (Lammel et al., 2015). Así, en los últimos años, las neuronas dopaminérgicas se han caracterizado a través del empleo del gen del transportador de dopamina (DAT) como marcador de la naturaleza neuronal dopaminérgica. El DAT es expresado por neuronas que emplean a la dopamina como neurotransmisor, ya que es un transportador que actúa como re-captador en las terminales sinápticas (Lorang et al., 1994). De esta forma, se ha evidenciado que los modelos de animales modificados genéticamente en que DAT se utiliza como conductor de la expresión de Cre brindan una mayor especificidad en cuanto a la selectividad de expresión de la recombinasa en neuronas dopaminérgicas (Bäckman et al., 2006; Lammel et al., 2015). Nuestros resultados al cruzar ratones  $Dat^{cre/+}$  con ratones reporteros Ai14 indicaron que la mayoría

de las neuronas tdTomate+ del ARC, del AVT y de la SN muestran señal inmuno-reactiva para TH. Así, la selectividad de la recombinación mostró congruencia con la expresión de TH en ambos núcleos cerebrales, detectada mediante inmuno-tinción, y con el perfil de expresión del DAT, de acuerdo a bases de datos de acceso abierto (*Allen Mouse Brain Atlas*). Además, nuestros resultados al realizar PCR cuantitativas para detectar la expresión del GHSR en los ratones  $Dat^{cre/+}-Ghsr^{n/n}$  indicaron que la expresión del receptor se da en las poblaciones neuronales del ARC y del AVT/SN en las que previamente se ha reportado expresión del GHSR (Abizaid et al., 2006; Zigman et al., 2006). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la selectividad de la expresión del GHSR en los animales  $Dat^{cre/+}-Ghsr^{n/n}$ , realizando PCR cuantitativas a partir de micro-disecciones de núcleos cerebrales en los que no se detecten niveles apreciables de expresión del GHSR y núcleos cerebrales en los que la expresión del GHSR se dé en poblaciones neuronales distintas a la población dopaminérgica. Así, se podrá corroborar que la expresión del GHSR en los ratones  $Dat^{cre/+}-Ghsr^{n/n}$  se produce exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, se podrían emplear otras estrategias para confirmar la expresión del receptor en las neuronas dopaminérgicas de los animales  $Dat^{cre/+}-Ghsr^{n/n}$ , como ISHH combinada con inmuno-tinciones para estimar la presencia del ARNm de GHSR exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas, inyecciones ICV de F-ghrelina para evidenciar el pegado del trazador en las neuronas TH, o cuantificaciones de los niveles de c-Fos en los núcleos neuronales con re-expresión del GHSR en respuesta a administraciones centrales de ghrelina.

Se ha descrito que una sub-población de neuronas dopaminérgicas del ARC es capaz de responder a ghrelina, ya que las mismas expresan el GHSR y aumentan la expresión de c-Fos frente a un ayuno de 24 horas (Zhang and van den Pol, 2016; Zigman et al., 2006). Por otra parte, la ghrelina aumenta la excitabilidad de las neuronas TH del ARC de rebanadas de cerebro de ratón y la activación optogenética de las neuronas TH del ARC de ratones induce la ingesta de alimento (Zhang and van den Pol, 2016). No obstante, nuestros resultados empleando ratones con expresión del GHSR exclusivamente en neuronas dopaminérgicas indicaron que la administración de ghrelina subcutánea, que impacta en el ARC, no aumenta la ingesta. Este resultado puede deberse a que la principal población neuronal del ARC que media el efecto orexigénico de la ghrelina es la de neuronas AgRP/NPY (Morton et al., 2006). Es posible también que las neuronas dopaminérgicas del ARC que medien el efecto orexigénico de la ghrelina no sean alcanzadas por la ghrelina plasmática. Sin embargo, la administración ICV de ghrelina tampoco incrementó la ingesta de alimento en los ratones  $Dat^{cre/+}-Ghsr^{n/n}$ . Así nuestros resultados indican que la ghrelina administrada por vía subcutánea o ICV a ratones  $Dat^{cre/+}-Ghsr^{n/n}$  no aumenta la ingesta y no apoyan la posibilidad de que las neuronas dopaminérgicas del ARC medien el efecto orexigénico de la ghrelina.

Las neuronas dopaminérgicas del AVT/SNpc también expresan el GHSR y son capaces de unir ghrelina (Abizaid et al., 2006; Zigman et al., 2006). La administración central de ghrelina aumenta la concentración de dopamina en el NAc, principal blanco de las neuronas dopaminérgicas del AVT (Jerlhag et al., 2006; Kawahara et al., 2009), y nuestros resultados indicaron que la ghrelina administrada por vía ICV aumenta el número de neuronas del AVT y del NAc que expresan c-Fos. La administración ICV de ghrelina a los animales  $Dat^{cre/+}-$

Ghsr<sup>n/n</sup> no produjo cambios en la ingesta, como se indica antes, ni en la actividad locomotora de estos animales, a diferencia de los ratones WT que aumentan ambos parámetros en respuesta a la administración central de ghrelina. Esto indicaría que la presencia del GHSR únicamente en neuronas dopaminérgicas no es suficiente para observar los efectos orexigénicos e hiperlocomotores de la hormona. Así, es posible que tanto los efectos de la ghrelina sobre el comportamiento, como sobre la expresión de c-Fos en el AVT y el NAcb, se deban a la acción de la hormona sobre otra población neuronal, como la población de neuronas GABA. Las neuronas GABA del AVT y de otros núcleos cerebrales, de acuerdo a nuestros resultados y a trabajos previos, también responden a ghrelina (Abizaid et al., 2006; Cabral et al., 2016). Por lo tanto, es probable que sea necesaria la expresión del GHSR en las neuronas GABA del AVT para que la acción de la ghrelina en esta zona del cerebro sea capaz de desencadenar los efectos hiperlocomotores descritos para la hormona.

El consumo de dietas apetecibles se asocia a la actividad del circuito mesolímbico ya que su ingesta representa un estímulo recompensante (Murray et al., 2014; Reichelt et al., 2015). El consumo de dietas palatables o soluciones azucaradas estimula la liberación de dopamina en el NAcb (Bassareo and Chiara, 1999; Hajnal and Norgren, 2001). Por otro lado, se ha descrito que la ghrelina regula el consumo de dietas palatables a través de su acción sobre el circuito mesolímbico (Perello and Dickson, 2015; Perelló and Zigman, 2012). Además, el consumo de DACG induce un aumento en el número de neuronas dopaminérgicas del AVT y de neuronas del NAcb que expresan c-Fos (Valdivia et al., 2014, 2015), y dichos aumentos involucran al sistema de ghrelina y GHSR, ya que los ratones Ghsr<sup>n/n</sup> no presentan activación de las neuronas dopaminérgicas en respuesta al consumo de DACG (Valdivia et al., 2015). Los ratones Ghsr<sup>n/n</sup> expuestos durante cuatro días consecutivos de forma limitada e intermitente a DACG presentan un patrón hiperfágico distinto al de los animales WT, lo que también muestra que el sistema de ghrelina y GHSR está ligado al perfil de ingesta observado en ratones WT (Valdivia et al., 2015). En este trabajo de Tesis, se empleó el protocolo de atracón inducido por exposición limitada e intermitente a DACG con el objetivo de estudiar un comportamiento regulado por el sistema de ghrelina y GHSR actuando sobre el circuito mesolímbico. Los estudios mostraron que los ratones WT, así como los Ghsr<sup>n/n</sup> y los Dat<sup>cre/+</sup>-Ghsr<sup>n/n</sup> muestran un perfil de escalado en la ingesta similar, consumiendo cantidades crecientes de DACG a lo largo de los días. Sin embargo, los ratones WT consumieron una cantidad mayor, cuando se compara el consumo acumulado durante los cuatro días, que los deficientes en el receptor de ghrelina. Los ratones con re-expresión del GHSR exclusivamente en neuronas dopaminérgicas mostraron un consumo acumulado similar al de los animales WT. Así, la presencia del GHSR en las neuronas dopaminérgicas es suficiente para reestablecer el nivel de hiperfagia inducida por exposición limitada e intermitente a DACG. Vale resaltar que la diferencia en la ingesta entre los distintos genotipos fue más evidente cuando se realizó la comparación del consumo acumulado durante los cuatro días. Esto probablemente se deba a que las diferencias entre los distintos genotipos son de pequeña magnitud, lo que dificulta la detección de diferencias en fenotipos de ingesta (Ellacott et al., 2010). Este fenómeno ha sido descrito en trabajos ya publicados que muestran que los animales deficientes en el GHSR consumen cantidades menores de dieta estándar durante la re-alimentación pos-ayuno de 48 horas (Fernandez et al., 2018). A pesar de ello, se

podieron evidenciar diferencias que ponen de manifiesto que la presencia del GHSR en neuronas dopaminérgicas tiene implicancias sobre la hiperfagia inducida por exposición limitada e intermitente a DACG.

Se ha mostrado que las neuronas dopaminérgicas del AVT regulan el efecto de refuerzo que tiene una DACG, ya que los ratones con activación optogenética de las neuronas TH del AVT presionan más veces la palanca activa en la prueba de tarea operante para obtener un pellet de DACG que los animales sin activación de las mismas (Adamantidis et al., 2011). Por otro lado, la re-expresión del GHSR en neuronas TH restaura parcialmente el establecimiento de la preferencia por un lugar asociado a una DACG inducido por ghrelina (Chuang et al., 2011). De acuerdo a nuestros resultados, la re-expresión del GHSR únicamente en neuronas dopaminérgicas mediaría comportamientos complejos, como la ingesta de DACG en el protocolo de atracón. El consumo de DACG a lo largo de los días involucra distintos aspectos comportamentales, como el grado en que la dieta les resulta apetecible a los animales o la capacidad de los mismos de asociar que la DACG se presenta por un tiempo limitado durante los cuatro días. Además, los mismos animales no mostraron diferencias en otros comportamientos como la actividad locomotora o el consumo de dieta estándar en respuesta a ghrelina. Un estudio publicado recientemente muestra que la re-expresión del GHSR en el AVT no cambia los parámetros asociados al metabolismo, a la ingesta y al comportamiento frente al estrés por novedad de los ratones cuando se los compara con ratones *knock-out* para el GHSR (Skov et al., 2017). Los ratones con re-expresión del GHSR en el AVT sólo muestran diferencias significativas con los ratones *knock-out* en las medidas de actividad locomotora inducida por cocaína. Así, tanto los resultados con animales con re-expresión del GHSR en el AVT como nuestros resultados empleando ratones  $Dat^{cre/+}$ - $Ghsr^{n/n}$  indicarían que el sistema de ghrelina y GHSR regula procesos complejos asociados a la función del circuito mesolímbico.

## **Estudio el rol del sistema de ghrelina y GHSR sobre la ingesta de alimento regulada por el circuito mesolímbico**

Debido a que la ghrelina es la única hormona conocida hasta el momento con efectos orexigénicos, se ha estudiado el posible rol que cumpliría en el desarrollo de desórdenes alimenticios. Los niveles plasmáticos de ghrelina en individuos obesos son inferiores a los hallados en individuos sanos (Shiia et al., 2002; Tschöp et al., 2001) y también se ha estudiado la relación de los niveles plasmáticos de ghrelina con el padecimiento de desorden alimenticio por atracón. Se considera que un individuo realiza un atracón cuando consume grandes cantidades de un alimento, en general de alto contenido calórico, en un lapso de tiempo corto y en momentos en que normalmente no deberían consumirse grandes cantidades de calorías. Se denomina desorden alimenticio por atracón si los atracones ocurren con una alta frecuencia durante un período de tiempo determinado y sin comportamientos compensatorios de purga, lo cual aumenta el riesgo de desarrollo de obesidad (Association, 2013; Wolfe et al., 2009). Un estudio muestra que los niveles plasmáticos de ghrelina en pacientes que sufren desorden alimenticio por atracón son menores que en individuos sanos (Geliebter et al., 2005), mientras que otro trabajo indica que los niveles plasmáticos de ghrelina en ayuno no correlacionan con la frecuencia o la severidad del desorden (Monteleone et al., 2005).

Como ya se ha descrito, los ratones  $Ghsr^{n/n}$  expuestos al protocolo de atracón por exposición limitada e intermitente a DACG ingieren menos DACG que los animales WT (Valdivia et al., 2015). De igual manera, un estudio independiente mostró que otro modelo de ratones deficientes en el receptor de ghrelina también ingieren menos cantidad de DACG en un protocolo de atracón por acceso intermitente y limitado a DACG (King et al., 2016). En los resultados presentados en este trabajo de Tesis, pudimos corroborar que los ratones  $Ghsr^{n/n}$  expuestos al protocolo de atracón ingieren menos DACG que los animales WT. Sin embargo, los animales  $Ghsr^{n/n}$  pierden tanto la actividad evocada del GHSR por unión de ghrelina como la actividad constitutiva del receptor, que se ha relacionado a la regulación de algunos aspectos fisiológicos (Pantel et al., 2006; Petersen et al., 2009). En particular, en un estudio reciente de nuestro laboratorio se mostró que la hiperfagia compensatoria que presentan los animales WT luego de un ayuno severo dependería, en parte, de la actividad constitutiva de GHSR (Fernandez et al., 2018). De esta manera, las diferencias en la ingesta de DACG entre los animales  $Ghsr^{n/n}$  y los WT podría deberse a la falta de actividad evocada o constitutiva del GHSR. Para discernir entre estas dos posibilidades, en el presente trabajo de Tesis evaluamos los valores de ghrelina plasmática en ratones expuestos al protocolo de exposición limitada e intermitente a DACG y también utilizamos una estrategia de manipulación farmacológica. Específicamente, expusimos ratones WT al protocolo de atracón y los inyectamos, previo a la ingesta de DACG cada día, diferentes ligandos del GHSR que modulan la actividad evocada y constitutiva del receptor.

Nuestros resultados mostraron que los niveles plasmáticos de ghrelina pre- y pos-ingesta de DACG en los ratones expuestos al protocolo de atracón son similares a los valores hallados en los animales control. En roedores alimentados *ad libitum* con dieta estándar, la concentración de ghrelina en circulación aumenta inmediatamente antes de que comience el ciclo de oscuridad, cuando los ratones ingieren la mayor parte de su ingesta diaria total, y luego desciende en forma pos-prandial (Drazen et al., 2006). Estos antecedentes se han interpretado como que la concentración plasmática de la ghrelina cumple un rol importante en transmitir el estado del balance energético corporal al cerebro. Nuestros resultados muestran que los niveles de ghrelina plasmática no cambian antes ni después de la ingesta de la DACG, dicha observación esperable ya que los animales expuestos al protocolo de atracón se encuentran en déficit energético. Así, la ingesta de DACG en nuestro protocolo experimental parece ser independiente de la concentración plasmática de ghrelina.

En concordancia con estos resultados, las administraciones subcutáneas de ghrelina no cambian el patrón de consumo de la DACG ni las cantidades de DACG consumidas por los ratones. Estos resultados refuerzan la idea de que la ingesta de DACG en nuestro protocolo de atracón ocurre independientemente de la ghrelina plasmática. Dado que los resultados presentados en este trabajo de Tesis indican que la ingesta de DACG en el protocolo de atracón depende de la presencia de GHSR en las neuronas dopaminérgicas, el hecho de que los niveles plasmáticos de ghrelina no correlacionen con los eventos de atracón es esperable ya que, como se indicó anteriormente, la ghrelina circulante no impacta en los núcleos del circuito mesolímbico.

A continuación, inyectamos ghrelina diariamente en el ventrículo cerebral unos minutos antes de exponer a los animales al protocolo de atracón y los resultados indicaron que desencadenar la actividad evocada del GHSR modifica el patrón de consumo de DACG, sin afectar la ingesta acumulada durante los 4 días de protocolo. Los ratones inyectados con LCRa previo a la ingesta de DACG consumen cantidades diarias crecientes de la dieta a lo largo de los días. Por otro lado, los ratones inyectados con ghrelina consumen cantidades similares de DACG durante los cuatro días del protocolo de atracón. Al comparar la ingesta de DACG del primer día, parecería que los animales tratados con ghrelina consumen una cantidad mayor de DACG respecto de los tratados con LCRa. Este resultado concuerda con lo que muestran trabajos previos en los que la administración por vía ICV de ghrelina aumenta de forma aguda la ingesta de DACG de ratas que son expuestas por primera vez a dicha dieta (Perez-Tilve et al., 2011). De igual modo, ratas que son acostumbradas a consumir durante dos semanas dieta estándar, sacarosa y grasa *ad libitum*, aumentan el consumo de grasa al ser inyectadas por vía ICV con ghrelina (Schéle et al., 2016). Así, es posible que en los animales inyectados ICV con ghrelina no se observe un escalamiento en la ingesta de DACG ya que el aumento en la ingesta de DACG que produce la administración de ghrelina el primer día del protocolo de atracón podría enmascarar el escalado posterior en la ingesta. Por otro lado, podría plantearse la hipótesis de que las sucesivas administraciones de ghrelina provoquen una desensibilización del GHSR, ya que se ha reportado que el tratamiento con ghrelina de cultivos celulares produce una desensibilización del GHSR por internalización celular que requiere alrededor de 24 horas para volver a condiciones basales (Portelli et al., 2012). De tal manera, las administraciones diarias de ghrelina a los ratones que consumen DACG en nuestros experimentos podrían provocar la desensibilización del GHSR, lo que haría que los animales no escalen el consumo de DACG. Finalmente, el hecho de que las administraciones ICV de ghrelina hayan cambiado el patrón de consumo de DACG indica que la activación del GHSR en el protocolo de atracón tiene implicancias en el fenotipo de ingesta. Sin embargo, la ghrelina plasmática no accede los núcleos del circuito mesolímbico que regularían la ingesta de DACG, por lo que las diferencias que causa la activación del GHSR se ponen de manifiesto sólo cuando la hormona se administra directamente en el cerebro.

A continuación, se empleó el compuesto sintético D-Lys-GHRP-6 que bloquea la actividad evocada del GHSR. Este compuesto ya ha sido utilizado en otros estudios y se ha mostrado que bloquea la ingesta de alimento inducida por la ghrelina, la re-alimentación de los animales luego de ayunos de 16 horas y el vaciado gástrico (Asakawa et al., 2003). Nuestros resultados empleando D-Lys-GHRP-6 indicaron que el bloqueo de la actividad evocada del GHSR no modifica la ingesta de DACG durante el protocolo de atracón, ya que tanto los animales inyectados con el antagonista del GHSR como los inyectados con LCRa escalan el consumo de DACG. Estos resultados concuerdan con el hecho de que no se detectan cambios en la concentración plasmática de ghrelina cuando se expone a los animales al protocolo de atracón, por lo que bloquear la actividad evocada del GHSR por unión de ghrelina no tiene implicancias en el patrón de ingesta observado.

Finalmente, nuestros resultados al administrar K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> muestran que el bloqueo de la actividad constitutiva del GHSR tiene efectos en el patrón de ingesta de DACG en el protocolo de atracón, ya que los

ratones tratados con dicho compuesto ingieren menos cantidad de dieta que los tratados con LCRa y no escalan la ingesta de DACG durante los cuatro días de protocolo. Como se indicó en secciones anteriores, el K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> bloquea la actividad constitutiva del GHSR, aunque también bloquea parcialmente el efecto orexigénico de la ghrelina (Els et al., 2012; Fernandez et al., 2018). Sin embargo, el hecho de que la administración del D-Lys-GHRP-6 no tenga efecto sobre el consumo de DACG en el protocolo de atracón y que los ratones tratados con el K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub> no presenten cambios en su peso corporal ni en la ingesta nocturna de dieta estándar, indica que el efecto del K-(D-1-Nal)-FwLL-NH<sub>2</sub>, a la dosis utilizada, sería principalmente a través de la actividad constitutiva del receptor y específicamente sobre el consumo de DACG. En estudios previos, se ha mostrado que la actividad constitutiva del receptor de ghrelina estaría involucrada en la regulación de la ingesta nocturna de roedores y de la hiperfagia que experimentan los ratones luego de un ayuno de 48 horas (Fernandez et al., 2018; Petersen et al., 2009). Además, estudios *in vitro* han demostrado que la actividad constitutiva del receptor de ghrelina inhibe las corrientes a través de los canales de calcio y disminuye la presencia de dichos canales en la membrana plasmática, disminuyendo la probabilidad de que se generen potenciales de acción en las neuronas (Mustafá et al., 2017; Soto et al., 2015). Así, podría proponerse que el efecto del GHSR como modulador del consumo de DACG en el protocolo de atracón se da por su capacidad de señalizar en ausencia de ghrelina. Por otro lado, el GHSR es capaz de heterodimerizar con otros receptores acoplados a proteínas G y de modular la actividad de estos receptores en respuesta a sus ligandos (Wellman and Abizaid, 2015). De particular interés resulta la heterodimerización del GHSR con el receptor de dopamina D2, ya que se han reportado cambios en los niveles de expresión de este receptor en trastornos de la ingesta (Chawla et al., 2017; Rospond et al., 2019). Así, una posible vía de regulación del consumo de DACG por la actividad constitutiva del GHSR sería a través de la regulación del D2, aunque son necesarios más estudios para poner en evidencia la existencia de este fenómeno.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis nos permiten concluir que:

- Las ghrelina plasmática es capaz de impactar en el AP del complejo dorsal del vago, en donde actúa principalmente sobre neuronas GABA para regular el vaciado gástrico.
- Las neuronas que expresan el GHSR del NTS están divididas en dos grandes grupos, uno rostral y otro caudal, los cuales responden frente a distintos estímulos relacionados con la ingesta y la regulación del tracto gastrointestinal.
- Las neuronas sensibles a ghrelina del AVT se localizan en las distintas subdivisiones del núcleo y son tanto de naturaleza dopaminérgica como GABA.
- Aumentos transitorios en la concentración plasmática de ghrelina no impactan sobre las neuronas del circuito mesolímbico.
- La presencia del GHSR únicamente en las neuronas dopaminérgicas es suficiente para mediar el rol de este receptor en el control de la magnitud de los atracones inducidos por exposición limitada e intermitente a DACG.
- La actividad del GHSR, independientemente de la ghrelina plasmática, modula la magnitud de los atracones producidos por exposición limitada e intermitente a DACG.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abercrombie, M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* 94, 239–247.
- Abizaid, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z. B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J. D., et al. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *Journal of Clinical Investigation* 116, 3229–3239. doi:10.1172/JCI29867.
- Adamantidis, A. R., Tsai, H.-C., Boutrel, B., Zhang, F., Stuber, G. D., Budygin, E. A., et al. (2011). Optogenetic Interrogation of Dopaminergic Modulation of the Multiple Phases of Reward-Seeking Behavior. *Journal of Neuroscience* 31, 10829–10835. doi:10.1523/JNEUROSCI.2246-11.2011.
- Amalric, M., and Koob, G. F. (1993). “Chapter 14 Functionally selective neurochemical afferents and efferents of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine system,” in *Progress in Brain Research Chemical Signalling in the Basal Ganglia.*, eds. G. W. Arbuthnott and P. C. Emson (Elsevier), 209–226. doi:10.1016/S0079-6123(08)61348-5.
- Andrews, Z. B., Erion, D., Beiler, R., Liu, Z.-W., Abizaid, A., Zigman, J., et al. (2009). Ghrelin Promotes and Protects Nigrostriatal Dopamine Function via a UCP2-Dependent Mitochondrial Mechanism. *J. Neurosci.* 29, 14057–14065. doi:10.1523/JNEUROSCI.3890-09.2009.
- Arnold, M., Mura, A., Langhans, W., and Geary, N. (2006). Gut Vagal Afferents Are Not Necessary for the Eating-Stimulatory Effect of Intraperitoneally Injected Ghrelin in the Rat. *J. Neurosci.* 26, 11052–11060. doi:10.1523/JNEUROSCI.2606-06.2006.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Katsuura, G., Fujimiya, M., Fujino, M. A., et al. (2003). Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52, 947–952. doi:10.1136/gut.52.7.947.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., et al. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120, 337–345.
- Association, A. P. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., et al. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms* 3, 525–534. doi:10.1242/dmm.006239.
- Bäckman, C. M., Malik, N., Zhang, Y., Shan, L., Grinberg, A., Hoffer, B. J., et al. (2006). Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *genesis* 44, 383–390. doi:10.1002/dvg.20228.
- Banks, W. A., Tschöp, M., Robinson, S. M., and Heiman, M. L. (2002). Extent and Direction of Ghrelin Transport Across the Blood-Brain Barrier Is Determined by Its Unique Primary Structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 822–827. doi:10.1124/jpet.102.034827.
- Bariselli, S., Glangetas, C., Tzanoulinou, S., and Bellone, C. (2016). Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *Journal of Neurochemistry* 139, 1071–1080. doi:10.1111/jnc.13779.
- Barraco, I. R. A. (1993). *Nucleus of the Solitary Tract*. CRC Press.
- Bassareo, V., and Chiara, G. D. (1999). Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *European Journal of Neuroscience* 11, 4389–4397. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00843.x.

- Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* 63, 182–217. doi:10.1124/pr.110.002642.
- Berridge, K. C., and Kringelbach, M. L. (2015). Pleasure Systems in the Brain. *Neuron* 86, 646–664. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.018.
- Bockaert, J. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* 18, 1723–1729. doi:10.1093/emboj/18.7.1723.
- Boekhoudt, L., Omrani, A., Luijendijk, M. C. M., Wolterink-Donselaar, I. G., Wijbrans, E. C., van der Plasse, G., et al. (2016). Chemogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, but not substantia nigra, induces hyperactivity in rats. *European Neuropsychopharmacology* 26, 1784–1793. doi:10.1016/j.euroneuro.2016.09.003.
- Boyчук, C. R., Gyarmati, P., Xu, H., and Smith, B. N. (2015). Glucose sensing by GABAergic neurons in the mouse nucleus tractus solitarius. *J. Neurophysiol.* 114, 999–1007. doi:10.1152/jn.00310.2015.
- Cabral, A., Cornejo, M. P., Fernandez, G., De Francesco, P. N., Garcia-Romero, G., Uriarte, M., et al. (2017a). Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice. *Endocrinology* 158, 1436–1449. doi:10.1210/en.2016-1815.
- Cabral, A., De Francesco, P. N., and Perello, M. (2015). Brain Circuits Mediating the Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin: Narrow Gates for a Vast Kingdom. *Frontiers in Endocrinology* 6. doi:10.3389/fendo.2015.00044.
- Cabral, A., Fernandez, G., and Perello, M. (2013). Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience* 253, 406–415. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.008.
- Cabral, A., López Soto, E. J., Epelbaum, J., and Perelló, M. (2017b). Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *International Journal of Molecular Sciences* 18, 638. doi:10.3390/ijms18030638.
- Cabral, A., Portiansky, E., Sánchez-Jaramillo, E., Zigman, J. M., and Perello, M. (2016). Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* 67, 27–39. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.01.027.
- Cabral, A., Suescun, O., Zigman, J. M., and Perello, M. (2012). Ghrelin Indirectly Activates Hypophysiotropic CRF Neurons in Rodents. *PLOS ONE* 7, e31462. doi:10.1371/journal.pone.0031462.
- Cabral, A., Valdivia, S., Fernandez, G., Reynaldo, M., and Perello, M. (2014). Divergent Neuronal Circuitries Underlying Acute Orexigenic Effects of Peripheral or Central Ghrelin: Critical Role of Brain Accessibility. *Journal of Neuroendocrinology* 26, 542–554. doi:10.1111/jne.12168.
- Callaghan, B., and Furness, J. B. (2014). Novel and Conventional Receptors for Ghrelin, Desacyl-Ghrelin, and Pharmacologically Related Compounds. *Pharmacol Rev* 66, 984–1001. doi:10.1124/pr.113.008433.
- Camiña, J. P., Lodeiro, M., Ischenko, O., Martini, A. C., and Casanueva, F. F. (2007). Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: Role of G-proteins and  $\beta$ -arrestins. *Journal of Cellular Physiology* 213, 187–200. doi:10.1002/jcp.21109.
- Chawla, A., Cordner, Z. A., Boersma, G., and Moran, T. H. (2017). Cognitive impairment and gene expression alterations in a rodent model of binge eating disorder. *Physiology & Behavior* 180, 78–90. doi:10.1016/j.physbeh.2017.08.004.
- Chen, Z., Travers, S. P., and Travers, J. B. (2016). Inhibitory modulation of optogenetically identified neuron subtypes in the rostral solitary nucleus. *Journal of Neurophysiology* 116, 391–403. doi:10.1152/jn.00168.2016.

- Chuang, J.-C., Perello, M., Sakata, I., Osborne-Lawrence, S., Savitt, J. M., Lutter, M., et al. (2011). Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice. *J Clin Invest* 121, 2684–2692. doi:10.1172/JCI57660.
- Coelho, E. F., Ferrari, M. F. R., Maximino, J. R., Chadi, G., and Fior-Chadi, D. R. (2004). Decreases in the expression of CGRP and galanin mRNA in central and peripheral neurons related to the control of blood pressure following experimental hypertension in rats. *Brain Research Bulletin* 64, 59–66. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.05.003.
- Cui, R. J., Li, X., and Appleyard, S. M. (2011). Ghrelin inhibits visceral afferent activation of catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J. Neurosci.* 31, 3484–3492. doi:10.1523/JNEUROSCI.3187-10.2011.
- Cummings, D. E. (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior* 89, 71–84. doi:10.1016/j.physbeh.2006.05.022.
- Curtis, K. S., Sved, A. F., Verbalis, J. G., and Stricker, E. M. (1994). Lithium chloride-induced anorexia, but not conditioned taste aversions, in rats with area postrema lesions. *Brain Res.* 663, 30–37.
- Damian, M., Marie, J., Leyris, J.-P., Fehrentz, J.-A., Verdié, P., Martinez, J., et al. (2012). High Constitutive Activity Is an Intrinsic Feature of Ghrelin Receptor Protein A STUDY WITH A FUNCTIONAL MONOMERIC GHS-R1a RECEPTOR RECONSTITUTED IN LIPID DISCS. *J. Biol. Chem.* 287, 3630–3641. doi:10.1074/jbc.M111.288324.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Saganuma, T., et al. (2000). Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans\*This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan, and the Ministry of Health and Welfare, Japan (to M.N.). *Endocrinology* 141, 4255–4261. doi:10.1210/endo.141.11.7757.
- Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijima, A., Matsuo, H., et al. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123, 1120–1128. doi:10.1053/gast.2002.35954.
- Date, Y., Nakazato, M., Murakami, N., Kojima, M., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). Ghrelin Acts in the Central Nervous System to Stimulate Gastric Acid Secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 904–907. doi:10.1006/bbrc.2000.4212.
- Davis, S. F., Derbenev, A. V., Williams, K. W., Glatzer, N. R., and Smith, B. N. (2004). Excitatory and inhibitory local circuit input to the rat dorsal motor nucleus of the vagus originating from the nucleus tractus solitarius. *Brain Research* 1017, 208–217. doi:10.1016/j.brainres.2004.05.049.
- De Francesco, P. N., Valdivia, S., Cabral, A., Reynaldo, M., Raingo, J., Sakata, I., et al. (2015). Neuroanatomical and functional characterization of CRF neurons of the amygdala using a novel transgenic mouse model. *Neuroscience* 289, 153–165. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.006.
- Denis, R. G. P., Joly-Amado, A., Webber, E., Langlet, F., Schaeffer, M., Padilla, S. L., et al. (2015). Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons. *Cell Metabolism* 22, 646–657. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.011.
- Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., Silva, I. da, Horvath, B., et al. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature Neuroscience* 9, 381–388. doi:10.1038/nn1656.

- Disse, E., Bussier, A. L., Deblon, N., Pfluger, P. T., Tschöp, M. H., Laville, M., et al. (2011). Systemic ghrelin and reward: Effect of cholinergic blockade. *Physiology & Behavior* 102, 481–484. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.006.
- Dornonville de la Cour, C., Björkqvist, M., Sandvik, A. K., Bakke, I., Zhao, C.-M., Chen, D., et al. (2001). A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regulatory Peptides* 99, 141–150. doi:10.1016/S0167-0115(01)00243-9.
- Dornonville de la Cour, C., Lindström, E., Norlén, P., and Håkanson, R. (2004). Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regulatory Peptides* 120, 23–32. doi:10.1016/j.regpep.2004.02.008.
- Drazen, D. L., Vahl, T. P., D'Alessio, D. A., Seeley, R. J., and Woods, S. C. (2006). Effects of a Fixed Meal Pattern on Ghrelin Secretion: Evidence for a Learned Response Independent of Nutrient Status. *Endocrinology* 147, 23–30. doi:10.1210/en.2005-0973.
- Egecioglu, E., Jerlhag, E., Salomé, N., Skibicka, K. P., Haage, D., Bohlooly-Y, M., et al. (2010). Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents: Ghrelin and food reward. *Addiction Biology* 15, 304–311. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00216.x.
- Ellacott, K. L. J., Morton, G. J., Woods, S. C., Tso, P., and Schwartz, M. W. (2010). Assessment of Feeding Behavior in Laboratory Mice. *Cell Metabolism* 12, 10–17. doi:10.1016/j.cmet.2010.06.001.
- Ellenbroek, B., and Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease Models & Mechanisms* 9, 1079–1087. doi:10.1242/dmm.026120.
- Els, S., Schild, E., Petersen, P. S., Kilian, T.-M., Mokrosinski, J., Frimurer, T. M., et al. (2012). An Aromatic Region To Induce a Switch between Agonism and Inverse Agonism at the Ghrelin Receptor. *J. Med. Chem.* 55, 7437–7449. doi:10.1021/jm300414b.
- Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P., Jobst, E. E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S. K., et al. (2007). Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab.* 5, 181–194. doi:10.1016/j.cmet.2007.02.004.
- Ester, M., Kriegel, H., Sander, J., and Xu, X. (1996). A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. in (AAAI Press), 226–231.
- Faulconbridge, L. F., Cummings, D. E., Kaplan, J. M., and Grill, H. J. (2003). Hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration. *Diabetes* 52, 2260–2265.
- Faulconbridge, L. F., Grill, H. J., Kaplan, J. M., and Daniels, D. (2008). Caudal brainstem delivery of ghrelin induces fos expression in the nucleus of the solitary tract, but not in the arcuate or paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Brain Research* 1218, 151–157. doi:10.1016/j.brainres.2008.04.068.
- Fawley, J. A., Peters, J. H., and Andresen, M. C. (2011). GABAB-mediated inhibition of multiple modes of glutamate release in the nucleus of the solitary tract. *Journal of Neurophysiology* 106, 1833–1840. doi:10.1152/jn.00476.2011.
- Fernandez, G., Cabral, A., Andreoli, M. F., Labarthe, A., M'Kadmi, C., Ramos, J. G., et al. (2018). Evidence Supporting a Role for Constitutive Ghrelin Receptor Signaling in Fasting-Induced Hyperphagia in Male Mice. *Endocrinology* 159, 1021–1034. doi:10.1210/en.2017-03101.
- Fernandez, G., Cabral, A., Cornejo, M. P., De Francesco, P. N., Garcia-Romero, G., Reynaldo, M., et al. (2016). Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *Journal of Neuroendocrinology* 28, n/a-n/a. doi:10.1111/jne.12349.

- Figueiredo, H. F., Bruestle, A., Bodie, B., Dolgas, C. M., and Herman, J. P. (2003). The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *European Journal of Neuroscience* 18, 2357–2364. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02932.x.
- Frecka, J. M., and Mattes, R. D. (2008). Possible entrainment of ghrelin to habitual meal patterns in humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294, G699–G707. doi:10.1152/ajpgi.00448.2007.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H. B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256–1272. doi:10.1124/mol.63.6.1256.
- Fry, M., and Ferguson, A. V. (2009). Ghrelin modulates electrical activity of area postrema neurons. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296, R485–R492. doi:10.1152/ajpregu.90555.2008.
- Fry, M., Hoyda, T. D., and Ferguson, A. V. (2007). Making sense of it: roles of the sensory circumventricular organs in feeding and regulation of energy homeostasis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 232, 14–26.
- Fujino, K., Inui, A., Asakawa, A., Kihara, N., Fujimura, M., and Fujimiya, M. (2003). Ghrelin Induces Fasted Motor Activity of the Gastrointestinal Tract in Conscious Fed Rats. *The Journal of Physiology* 550, 227–240. doi:10.1113/jphysiol.2003.040600.
- Ganchrow, D., Ganchrow, J. R., Cicchini, V., Bartel, D. L., Kaufman, D., Girard, D., et al. (2013). Nucleus of the solitary tract in the C57BL/6J mouse: Subnuclear parcellation, chorda tympani nerve projections, and brainstem connections. *Journal of Comparative Neurology* 522, 1565–1596. doi:10.1002/cne.23484.
- Gao, H., Glatzer, N. R., Williams, K. W., Derbenev, A. V., Liu, D., and Smith, B. N. (2009). Morphological and electrophysiological features of motor neurons and putative interneurons in the dorsal vagal complex of rats and mice. *Brain Research* 1291, 40–52. doi:10.1016/j.brainres.2009.07.024.
- Geliebter, A., Gluck, M. E., and Hashim, S. A. (2005). Plasma Ghrelin Concentrations Are Lower in Binge-Eating Disorder. *J Nutr* 135, 1326–1330. doi:10.1093/jn/135.5.1326.
- Gelman, D. M., Noaín, D., Avale, M. E., Otero, V., Low, M. J., and Rubinstein, M. (2003). Transgenic mice engineered to target Cre/loxP-mediated DNA recombination into catecholaminergic neurons. *genesis* 36, 196–202. doi:10.1002/gene.10217.
- Gilg, S., and Lutz, T. A. (2006). The orexigenic effect of peripheral ghrelin differs between rats of different age and with different baseline food intake, and it may in part be mediated by the area postrema. *Physiology & Behavior* 87, 353–359. doi:10.1016/j.physbeh.2005.10.015.
- Goebel-Stengel, M., Wang, L., Stengel, A., and Taché, Y. (2011). Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Research* 1396, 20–34. doi:10.1016/j.brainres.2011.04.031.
- Goldstein, J. L., Zhao, T. —., Li, R. L., Sherbet, D. P., Liang, G., and Brown, M. S. (2011). Surviving Starvation: Essential Role of the Ghrelin-Growth Hormone Axis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76, 121–127. doi:10.1101/sqb.2011.76.010447.
- González, C. R., Vázquez, M. J., López, M., and Diéguez, C. (2008). Influence of chronic undernutrition and leptin on GOAT mRNA levels in rat stomach mucosa. *Journal of Molecular Endocrinology* 41, 415–421. doi:10.1677/JME-08-0102.

- Grabauskas, G., Wu, X., Lu, Y., Heldsinger, A., Song, I., Zhou, S.-Y., et al. (2015). KATP channels in the nodose ganglia mediate the orexigenic actions of ghrelin. *The Journal of Physiology* 593, 3973–3989. doi:10.1113/JP270788.
- Grattan, D. R. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *Journal of Endocrinology* 226, T101–T122. doi:10.1530/JOE-15-0213.
- Guan, X.-M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J. S., et al. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 48, 23–29. doi:10.1016/S0169-328X(97)00071-5.
- Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Willency, J. A., Knierman, M. D., Jin, Z., et al. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *PNAS* 105, 6320–6325. doi:10.1073/pnas.0800708105.
- Hajnal, A., and Norgren, R. (2001). Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Research* 904, 76–84. doi:10.1016/S0006-8993(01)02451-9.
- Hashimoto, H., Fujihara, H., Kawasaki, M., Saito, T., Shibata, M., Otsubo, H., et al. (2007). Centrally and Peripherally Administered Ghrelin Potently Inhibits Water Intake in Rats. *Endocrinology* 148, 1638–1647. doi:10.1210/en.2006-0993.
- Hedrich, H. J., and Bullock, G. R. eds. (2004). *The laboratory mouse*. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Hewson, A. K., and Dickson, S. L. (2001). Systemic Administration of Ghrelin Induces Fos and Egr-1 Proteins in the Hypothalamic Arcuate Nucleus of Fasted and Fed Rats: Induction of immediate early genes by ghrelin in CNS. *Journal of Neuroendocrinology* 12, 1047–1049. doi:10.1046/j.1365-2826.2000.00584.x.
- Hoffman, G. E., Le, W.-W., Abbud, R., Lee, W.-S., and Susan Smith, M. (1994). Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. *Brain Research* 654, 207–215. doi:10.1016/0006-8993(94)90481-2.
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T. H., Ankersen, M., and Schwartz, T. W. (2003). High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol. Endocrinol.* 17, 2201–2210. doi:10.1210/me.2003-0069.
- Huang, S., Lee, S. A., Oswald, K. E., and Fry, M. (2015). Ghrelin alters neurite outgrowth and electrophysiological properties of mouse ventrolateral arcuate tyrosine hydroxylase neurons in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 466, 682–688. doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.069.
- Hunt, G. E., and McGregor, I. S. (1998). Rewarding brain stimulation induces only sparse Fos-like immunoreactivity in dopaminergic neurons. *Neuroscience* 83, 501–515. doi:10.1016/S0306-4522(97)00409-0.
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews* 56, 27–78. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.004.
- Jerlhag, E. (2008). Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addiction Biology* 13, 358–363. doi:10.1111/j.1369-1600.2008.00125.x.
- Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S. L., Douhan, A., Svensson, L., and Engel, J. A. (2006). Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular

- concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addiction Biology* 12, 6–16. doi:10.1111/j.1369-1600.2006.00041.x.
- Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S. L., and Engel, J. A. (2010). Glutamatergic regulation of ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system: Mechanisms for ghrelin-induced reinforcement. *Addiction Biology* 16, 82–91. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00231.x.
- Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S. L., Svensson, L., and Engel, J. A. (2008). Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *European Neuropsychopharmacology* 18, 508–518. doi:10.1016/j.euroneuro.2008.02.006.
- Jerlhag, E., Egecioglu, E., Landgren, S., Salome, N., Heilig, M., Moechars, D., et al. (2009). Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 11318–11323. doi:10.1073/pnas.0812809106.
- Kachidian, P., and Pickel, V. M. (1993). Localization of tyrosine hydroxylase in neuronal targets and efferents of the area postrema in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 329, 337–353. doi:10.1002/cne.903290305.
- Kaur, C., and Ling, E.-A. (2017). The circumventricular organs. *Histol. Histopathol.* 32, 879–892. doi:10.14670/HH-11-881.
- Kawahara, Y., Kawahara, H., Kaneko, F., Yamada, M., Nishi, Y., Tanaka, E., et al. (2009). Peripherally administered ghrelin induces bimodal effects on the mesolimbic dopamine system depending on food-consumptive states. *Neuroscience* 161, 855–864. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.086.
- Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27, 765–776. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.015.
- Kiba, H., and Jayaraman, A. (1994). Nicotine induced c-fos expression in the striatum is mediated mostly by dopamine D 1 receptor and is dependent on NMDA stimulation. *Molecular Brain Research*, 13.
- King, M. S. (2007). “Anatomy of the Rostral Nucleus of the Solitary Tract,” in *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing* Frontiers in Neuroscience., ed. R. M. Bradley (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2541/> [Accessed November 24, 2017].
- King, M. S., and Bradley, R. M. (1994). Relationship between structure and function of neurons in the rat rostral nucleus tractus solitarii. *J. Comp. Neurol.* 344, 50–64. doi:10.1002/cne.903440105.
- King, S. J., Rodrigues, T., Watts, A., Murray, E., Wilson, A., and Abizaid, A. (2016). Investigation of a role for ghrelin signaling in binge-like feeding in mice under limited access to high-fat diet. *Neuroscience* 319, 233–245. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.004.
- Konigsmark, B. W. (1970). “Methods for the Counting of Neurons,” in *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, eds. W. J. H. Nauta and S. O. E. Ebesson (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 315–340. doi:10.1007/978-3-642-85986-1\_14.
- Kovács, K. J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International* 33, 287–297. doi:10.1016/S0197-0186(98)00023-0.
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 665–672. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x.

- Lammel, S., Lim, B. K., and Malenka, R. C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76, 351–359. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.019.
- Lammel, S., Steinberg, E. E., Földy, C., Wall, N. R., Beier, K., Luo, L., et al. (2015). Diversity of Transgenic Mouse Models for Selective Targeting of Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* 85, 429–438. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.036.
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176. doi:10.1038/nature05453.
- Li, Y., Wu, X., Zhao, Y., Chen, S., and Owyang, C. (2006). Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1350–1358. doi:10.1152/ajpgi.00493.2005.
- Lin Yingzi, Matsumura Kiyoshi, Fukuhara Masayo, Kagiya Shuntaro, Fujii Koji, and Iida Mitsuo (2004). Ghrelin Acts at the Nucleus of the Solitary Tract to Decrease Arterial Pressure in Rats. *Hypertension* 43, 977–982. doi:10.1161/01.HYP.0000122803.91559.55.
- Lockie, S. H., Dinan, T., Lawrence, A. J., Spencer, S. J., and Andrews, Z. B. (2015). Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in reward processing tasks. *Psychoneuroendocrinology* 62, 114–120. doi:10.1016/j.psneuen.2015.08.004.
- Lorang, D., Amara, S. G., and Simerly, R. B. (1994). Cell-type-specific expression of catecholamine transporters in the rat brain. *J. Neurosci.* 14, 4903–4914. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-08-04903.1994.
- Luquet, S., Perez, F. A., Hnasko, T. S., and Palmiter, R. D. (2005). NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates. *Science* 310, 683–685. doi:10.1126/science.1115524.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133–140. doi:10.1038/nn.2467.
- Maley, B. E., Newton, B. W., Howes, K. A., Herman, L. M., Oloff, C. M., Smith, K. C., et al. (1987). Immunohistochemical localization of substance P and enkephalin in the nucleus tractus solitarii of the rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *Journal of Comparative Neurology* 260, 483–490. doi:10.1002/cne.902600402.
- Mani, B. K., Osborne-Lawrence, S., Mequinion, M., Lawrence, S., Gautron, L., Andrews, Z. B., et al. (2017). The role of ghrelin-responsive mediobasal hypothalamic neurons in mediating feeding responses to fasting. *Mol Metab* 6, 882–896. doi:10.1016/j.molmet.2017.06.011.
- Mani, B. K., Walker, A. K., Lopez Soto, E. J., Raingo, J., Lee, C. E., Perelló, M., et al. (2014). Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse. *J. Comp. Neurol.* 522, 3644–3666. doi:10.1002/cne.23627.
- Margolis, E. B., Toy, B., Himmels, P., Morales, M., and Fields, H. L. (2012). Identification of Rat Ventral Tegmental Area GABAergic Neurons. *PLOS ONE* 7, e42365. doi:10.1371/journal.pone.0042365.
- Maswood, N., Young, J., Tilmont, E., Zhang, Z., Gash, D. M., Gerhardt, G. A., et al. (2004). Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *PNAS* 101, 18171–18176. doi:10.1073/pnas.0405831102.
- McDougall, and Andresen (2012). Low-fidelity GABA transmission within a dense excitatory network of the solitary tract nucleus. *The Journal of Physiology* 590, 5677–5689. doi:10.1113/jphysiol.2012.241976.



- McKinley, M. J., McAllen, R. M., Davern, P., Giles, M. E., Penschow, J., Sunn, N., et al. (2003). The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 172, III–XII, 1–122, back cover.
- McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., and Pinto, A. R. (2017). “Cre- lox P-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations: Cre- lox P-Mediated Recombination,” in *Current Protocols in Mouse Biology*, eds. J. Auwerx, S. L. Ackerman, S. D. Brown, M. J. Justice, and J. Nadeau (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 1–12. doi:10.1002/cpmo.22.
- Meredith, G. E., Pennartz, C. M. A., and Groenewegen, H. J. (1993). “Chapter 1 The cellular framework for chemical signalling in the nucleus accumbens,” in *Progress in Brain Research Chemical Signalling in the Basal Ganglia*, eds. G. W. Arbuthnott and P. C. Emson (Elsevier), 3–24. doi:10.1016/S0079-6123(08)61335-7.
- Messini, C. I., Malandri, M., Anifandis, G., Dafopoulos, K., Georgoulas, P., Sveronis, G., et al. (2017). Submaximal doses of ghrelin do not inhibit gonadotrophin levels but stimulate prolactin secretion in postmenopausal women. *Clinical Endocrinology* 87, 44–50. doi:10.1111/cen.13349.
- Meye, F. J., and Adan, R. A. H. (2014). Feelings about food: the ventral tegmental area in food reward and emotional eating. *Trends in Pharmacological Sciences* 35, 31–40. doi:10.1016/j.tips.2013.11.003.
- M’Kadmi, C., Leyris, J.-P., Onfroy, L., Galés, C., Saulière, A., Gagne, D., et al. (2015). Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 290, 27021–27039. doi:10.1074/jbc.M115.659250.
- Monteleone, P., Bencivenga, R., Longobardi, N., Serritella, C., and Maj, M. (2003). Differential Responses of Circulating Ghrelin to High-Fat or High-Carbohydrate Meal in Healthy Women. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5510–5514. doi:10.1210/jc.2003-030797.
- Monteleone, P., Fabrazzo, M., Tortorella, A., Martiadis, V., Serritella, C., and Maj, M. (2005). Circulating ghrelin is decreased in non-obese and obese women with binge eating disorder as well as in obese non-binge eating women, but not in patients with bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 30, 243–250. doi:10.1016/j.psyneuen.2004.07.004.
- Morales, M., and Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 18, 73–85. doi:10.1038/nrn.2016.165.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., and Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295. doi:10.1038/nature05026.
- Müller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., et al. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism* 4, 437–460. doi:10.1016/j.molmet.2015.03.005.
- Murray, S., Tulloch, A., Gold, M. S., and Avena, N. M. (2014). Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 540–552. doi:10.1038/nrendo.2014.91.
- Mustafá, E. R., Soto, E. J. L., Damonte, V. M., Rodríguez, S. S., Lipscombe, D., and Raingo, J. (2017). Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in a CaVβ-dependent manner. *J Cell Sci* 130, 3907–3917. doi:10.1242/jcs.207886.
- Nair-Roberts, R. G., Chatelain-Badie, S. D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J. P., and Ungless, M. A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152, 1024–1031. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.046.

- Page, A. J., Slattery, J. A., Milte, C., Laker, R., O'Donnell, T., Dorian, C., et al. (2007). Ghrelin selectively reduces mechanosensitivity of upper gastrointestinal vagal afferents. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G1376–G1384. doi:10.1152/ajpgi.00536.2006.
- Pantel, J., Legendre, M., Cabrol, S., Hilal, L., Hajaji, Y., Morisset, S., et al. (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116, 760–768. doi:10.1172/JCI25303.
- Patterson, M., Murphy, K. G., le Roux, C. W., Ghatel, M. A., and Bloom, S. R. (2005). Characterization of Ghrelin-Like Immunoreactivity in Human Plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2205–2211. doi:10.1210/jc.2004-1641.
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 350.
- Perello, M., and Dickson, S. L. (2015). Ghrelin Signalling on Food Reward: A Salient Link Between the Gut and the Mesolimbic System. *Journal of Neuroendocrinology* 27, 424–434. doi:10.1111/jne.12236.
- Perello, M., Sakata, I., Birnbaum, S., Chuang, J.-C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S. A., et al. (2010). Ghrelin Increases the Rewarding Value of High-Fat Diet in an Orexin-Dependent Manner. *Biological Psychiatry* 67, 880–886. doi:10.1016/j.biopsych.2009.10.030.
- Perello M, Scott Michael M., Sakata Ichiro, Lee Charlotte E., Chuang Jen-Chieh, Osborne-Lawrence Sherri, et al. (2012). Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *Journal of Comparative Neurology* 520, 281–294. doi:10.1002/cne.22690.
- Perelló, M., and Zigman, J. M. (2012). The Role of Ghrelin in Reward-Based Eating. *Biological Psychiatry* 72, 347–353. doi:10.1016/j.biopsych.2012.02.016.
- Perez-Tilve, D., Heppner, K., Kirchner, H., Lockie, S. H., Woods, S. C., Smiley, D. L., et al. (2011). Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. *The FASEB Journal* 25, 2814–2822. doi:10.1096/fj.11-183632.
- Petersen, P. S., Woldbye, D. P. D., Madsen, A. N., Egerod, K. L., Jin, C., Lang, M., et al. (2009). In Vivo Characterization of High Basal Signaling from the Ghrelin Receptor. *Endocrinology* 150, 4920–4930. doi:10.1210/en.2008-1638.
- Phillipson, O. T. (1979). The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of tsai in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 187, 85–98. doi:10.1002/cne.901870106.
- Pirnik, Z., Majercikova, Z., Holubova, M., Pirnik, R., Zelezna, B., Maletinska, L., et al. (2014). EFFECT OF GHRELIN RECEPTOR AGONIST AND ANTAGONIST ON THE ACTIVITY OF ARCUATE NUCLEUS TYROSINE HYDROXYLASE CONTAINING NEURONS IN C57BL/6 MALE MICE EXPOSED TO NORMAL OR HIGH FAT DIET. 10.
- Porges, S. W. (2001). The polyvagal theory: phylogenetic substrates of a social nervous system. *International Journal of Psychophysiology* 42, 123–146. doi:10.1016/S0167-8760(01)00162-3.
- Portelli, J., Thielemans, L., Ver Donck, L., Loyens, E., Coppens, J., Aourz, N., et al. (2012). Inactivation of the Constitutively Active Ghrelin Receptor Attenuates Limbic Seizure Activity in Rodents. *Neurotherapeutics* 9, 658–672. doi:10.1007/s13311-012-0125-x.
- Price, C. J., Hoyda, T. D., and Ferguson, A. V. (2008). The Area Postrema: A Brain Monitor and Integrator of Systemic Autonomic State. *Neuroscientist* 14, 182–194. doi:10.1177/1073858407311100.

- Prieto-Garcia, L., Egecioglu, E., Studer, E., Westberg, L., and Jerlhag, E. (2015). Ghrelin and GHS-R1A signaling within the ventral and laterodorsal tegmental area regulate sexual behavior in sexually naïve male mice. *Psychoneuroendocrinology* 62, 392–402. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.009.
- Reichelt, A. C., Westbrook, R. F., and Morris, M. J. (2015). Integration of reward signalling and appetite regulating peptide systems in the control of food-cue responses. *British Journal of Pharmacology* 172, 5225–5238. doi:10.1111/bph.13321.
- Rinaman, L. (1999). A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *Am. J. Physiol.* 277, R1537–1540.
- Rinaman, L. (2010). Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res.* 1350, 18–34. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.059.
- Rindi, G., Necchi, V., Savio, A., Torsello, A., Zoli, M., Locatelli, V., et al. (2002). Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol* 117, 511–519. doi:10.1007/s00418-002-0415-1.
- Ritter, S., Dinh, T. T., and Zhang, Y. (2000). Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res.* 856, 37–47.
- Roda, A., Mezzanotte, L., Aldini, R., Michelini, E., and Cevenini, L. (2010). A new gastric-emptying mouse model based on in vivo non-invasive bioluminescence imaging. *Neurogastroenterology & Motility* 22, 1117–e288. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01535.x.
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66, 105–143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005.
- Rospond, B., Sadakierska-Chudy, A., Kazek, G., Krośniak, M., Bystrowska, B., and Filip, M. (2019). Assessment of metabolic and hormonal profiles and striatal dopamine D2 receptor expression following continuous or scheduled high-fat or high-sucrose diet in rats. *Pharmacological Reports* 71, 1–12. doi:10.1016/j.pharep.2018.09.005.
- Sakata, I., Yamazaki, M., Inoue, K., Hayashi, Y., Kangawa, K., and Sakai, T. (2003). Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neuroscience Letters* 342, 183–186. doi:10.1016/S0304-3940(03)00294-5.
- Saleem, M., Martin, H., and Coates, P. (2018). Prolactin Biology and Laboratory Measurement: An Update on Physiology and Current Analytical Issues. *Clin Biochem Rev* 39, 3–16.
- Sanchez-Catalan, M. J., Kaufling, J., Georges, F., Veinante, P., and Barrot, M. (2014). The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 282, 198–216. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.025.
- Schaeffer, M., Langlet, F., Lafont, C., Molino, F., Hodson, D. J., Roux, T., et al. (2013). Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *PNAS* 110, 1512–1517. doi:10.1073/pnas.1212137110.
- Schéle, E., Bake, T., Rabasa, C., and Dickson, S. L. (2016). Centrally Administered Ghrelin Acutely Influences Food Choice in Rodents. *PLOS ONE* 11, e0149456. doi:10.1371/journal.pone.0149456.
- Schellekens, H., De Francesco, P. N., Kandil, D., Theeuwes, W. F., McCarthy, T., van Oeffelen, W. E. P. A., et al. (2015). Ghrelin's Orexigenic Effect Is Modulated via a Serotonin 2C Receptor Interaction. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1186–1197. doi:10.1021/cn500318q.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.
- Schultz, W. (2013). Updating dopamine reward signals. *Current Opinion in Neurobiology* 23, 229–238. doi:10.1016/j.conb.2012.11.012.
- Schwarz, J., Burguet, J., Rampin, O., Fromentin, G., Andrey, P., Tomé, D., et al. (2010). Three-dimensional macronutrient-associated Fos expression patterns in the mouse brainstem. *PLoS ONE* 5, e8974. doi:10.1371/journal.pone.0008974.
- Scott, M. M., Perello, M., Chuang, J.-C., Sakata, I., Gautron, L., Lee, C. E., et al. (2012). Hindbrain Ghrelin Receptor Signaling Is Sufficient to Maintain Fasting Glucose. *PLOS ONE* 7, e44089. doi:10.1371/journal.pone.0044089.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 22, 1567–1572. doi:10.1038/nbt1037.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2, 905–909. doi:10.1038/nmeth819.
- Shi, X., Chacko, S., Li, F., Li, D., Burrin, D., Chan, L., et al. (2017). Acute activation of GLP-1-expressing neurons promotes glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Molecular Metabolism* 6, 1350–1359. doi:10.1016/j.molmet.2017.08.009.
- Shiia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M. S., Tanaka, M., et al. (2002). Plasma Ghrelin Levels in Lean and Obese Humans and the Effect of Glucose on Ghrelin Secretion. 5.
- Shoji, E., Okumura, T., Onodera, S., Takahashi, N., Harada, K., and Kohgo, Y. (1997). Gastric emptying in OLETF rats not expressing CCK-A receptor gene. *Dig. Dis. Sci.* 42, 915–919.
- Skov, L., Jensen, M., Christiansen, S., Ratner, C., Woldbye, D., and Holst, B. (2017). Exploring the Behavioral and Metabolic Phenotype Generated by Re-Introduction of the Ghrelin Receptor in the Ventral Tegmental Area. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 914. doi:10.3390/ijms18050914.
- Soto, E. J. L., Agosti, F., Cabral, A., Mustafa, E. R., Damonte, V. M., Gandini, M. A., et al. (2015). Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *The Journal of General Physiology* 146, 205–219. doi:10.1085/jgp.201511383.
- Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Taché, Y., Sachs, G., and Lambrecht, N. W. G. (2010). Differential distribution of ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) immunoreactive cells in the mouse and rat gastric oxyntic mucosa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392, 67–71. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.169.
- Stievenard, A., Méquinion, M., Andrews, Z. B., Destée, A., Chartier-Harlin, M.-C., Viltart, O., et al. (2017). Is there a role for ghrelin in central dopaminergic systems? Focus on nigrostriatal and mesocorticolimbic pathways. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 73, 255–275. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.11.021.
- St-Onge, V., Watts, A., and Abizaid, A. (2016). Ghrelin enhances cue-induced bar pressing for high fat food. *Hormones and Behavior* 78, 141–149. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.11.005.
- Swartz, E. M., Browning, K. N., Travagli, R. A., and Holmes, G. M. (2014). Ghrelin increases vagally mediated gastric activity by central sites of action. *Neurogastroenterology & Motility* 26, 272–282. doi:10.1111/nmo.12261.

- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., et al. (2011). A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron* 71, 995–1013. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.026.
- Toshinai, K., Mondal, M. S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., et al. (2001). Upregulation of Ghrelin Expression in the Stomach upon Fasting, Insulin-Induced Hypoglycemia, and Leptin Administration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281, 1220–1225. doi:10.1006/bbrc.2001.4518.
- Traub, R. J., Sengupta, J. N., and Gebhart, G. F. (1996). Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience* 74, 873–884.
- Tschöp, M., Weyer, C., Tataranni, P. A., Devanarayan, V., Ravussin, E., and Heiman, M. L. (2001). Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity. *Diabetes* 50, 707–709. doi:10.2337/diabetes.50.4.707.
- Tümer, C., Oflazoğlu, H. D., Obay, B. D., Kelle, M., and Taşdemir, E. (2008). Effect of ghrelin on gastric myoelectric activity and gastric emptying in rats. *Regulatory Peptides* 146, 26–32. doi:10.1016/j.regpep.2007.07.008.
- Ungless, M. A., and Grace, A. A. (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends in Neurosciences* 35, 422–430. doi:10.1016/j.tins.2012.02.003.
- Valdivia, S., Cornejo, M. P., Reynaldo, M., De Francesco, P. N., and Perello, M. (2015). Escalation in high fat intake in a binge eating model differentially engages dopamine neurons of the ventral tegmental area and requires ghrelin signaling. *Psychoneuroendocrinology* 60, 206–216. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.06.018.
- Valdivia, S., Patrone, A., Reynaldo, M., and Perello, M. (2014). Acute High Fat Diet Consumption Activates the Mesolimbic Circuit and Requires Orexin Signaling in a Mouse Model. *PLoS ONE* 9, e87478. doi:10.1371/journal.pone.0087478.
- Vrang, N., Phifer, C. B., Corkern, M. M., and Berthoud, H.-R. (2003). Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R470–478. doi:10.1152/ajpregu.00732.2002.
- Wellman, M., and Abizaid, A. (2015). Growth Hormone Secretagogue Receptor Dimers: A New Pharmacological Target,. *eNeuro* 2. doi:10.1523/ENEURO.0053-14.2015.
- Whitehead, M. C. (1990). Subdivisions and neuron types of the nucleus of the solitary tract that project to the parabrachial nucleus in the hamster. *J. Comp. Neurol.* 301, 554–574. doi:10.1002/cne.903010406.
- Willesen, M. G., Kristensen, P., and Rømer, J. (1999). Co-Localization of Growth Hormone Secretagogue Receptor and NPY mRNA in the Arcuate Nucleus of the Rat. *NEN* 70, 306–316. doi:10.1159/000054491.
- Winter, B. Y. D., Man, J. G. D., Seerden, T. C., Depoortere, I., Herman, A. G., Peeters, T. L., et al. (2004). Effect of ghrelin and growth hormone-releasing peptide 6 on septic ileus in mice. *Neurogastroenterology & Motility* 16, 439–446. doi:10.1111/j.1365-2982.2004.00564.x.
- Wojcik, S. M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N., et al. (2006). A Shared Vesicular Carrier Allows Synaptic Corelease of GABA and Glycine. *Neuron* 50, 575–587. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.016.
- Wolfe, B. E., Baker, C. W., Smith, A. T., and Kelly-Weeder, S. (2009). Validity and utility of the current definition of binge eating. *Int J Eat Disord* 42, 674–686. doi:10.1002/eat.20728.

- Wu, Q., Clark, M. S., and Palmiter, R. D. (2012). Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. *Nature* 483, 594–597. doi:10.1038/nature10899.
- Yanagi, S., Sato, T., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2018). The Homeostatic Force of Ghrelin. *Cell Metabolism* 27, 786–804. doi:10.1016/j.cmet.2018.02.008.
- Yang, C.-G., Yang, C.-G., Wang, W.-G., Wang, W.-G., Yan, J., Yan, J., et al. (2013). Gastric motility in ghrelin receptor knockout mice. *Molecular Medicine Reports* 7, 83–88. doi:10.3892/mmr.2012.1157.
- Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V., and Goldstein, J. L. (2008). Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell* 132, 387–396. doi:10.1016/j.cell.2008.01.017.
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A., and Zahm, D. S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* 282, 23–48. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.04.010.
- Yip, S. H., York, J., Hyland, B., Bunn, S. J., and Grattan, D. R. (2018). Incomplete concordance of dopamine transporter Cre (DAT IREScre)-mediated recombination and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the mouse forebrain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 90, 40–48. doi:10.1016/j.jchemneu.2017.12.002.
- Young, A. (2005). “Inhibition of Gastric Emptying,” in *Advances in Pharmacology* Amylin: Physiology and Pharmacology. (Academic Press), 99–121. doi:10.1016/S1054-3589(05)52006-4.
- Zhang, W., Chai, B., Li, J., Wang, H., and Mulholland, M. W. (2008). Effect of Des-acyl Ghrelin on Adiposity and Glucose Metabolism. *Endocrinology* 149, 4710–4716. doi:10.1210/en.2008-0263.
- Zhang, X., and van den Pol, A. N. (2016). Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nature Neuroscience* 19, 1341–1347. doi:10.1038/nn.4372.
- Zhao, T.-J., Liang, G., Li, R. L., Xie, X., Sleeman, M. W., Murphy, A. J., et al. (2010). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *PNAS* 107, 7467–7472. doi:10.1073/pnas.1002271107.
- Zhao, Z., Liu, H., Xiao, K., Yu, M., Cui, L., Zhu, Q., et al. (2014). Ghrelin administration enhances neurogenesis but impairs spatial learning and memory in adult mice. *Neuroscience* 257, 175–185. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.063.
- Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B., and Elmquist, J. K. (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology* 494, 528–548. doi:10.1002/cne.20823.
- Zigman, J. M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J. N., Lee, C. E., et al. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115, 3564–3572. doi:10.1172/JCI26002.

## TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- 1 – *“Escalation in high-fat intake in a binge eating model differentially engages dopaminergic neurons of the ventral tegmental area and requires ghrelin signaling”*. Valdivia S, Cornejo MP, De Francesco PN, Reynaldo M, Perelló M. Psychoneuroendocrinology. 2015.
- 2 – *“Des-acyl ghrelin directly targets the arcuate nucleus in a ghrelin-receptor independent manner and impairs the orexigenic effect of ghrelin”*. Fernández G, Cabral A, Cornejo MP, De Francesco PN, García Romero G, Reynaldo M, Perelló M. J Neuroendocrinology. 2015.
- 3 – *“Neuroendocrine regulation of metabolism”*. Cornejo MP, Hentges ST, Maliqueo M, Coirini H, Becú-Villalobos D, Elias CF. J Neuroendocrinology. 2016.
- 4 – *“Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice”*. Cabral A & Cornejo MP, Fernández G, De Francesco PN, García Romero G, Uriarte M, Zigman JM, Portiansky E, Reynaldo M, Perelló M. Endocrinology, 2017.
- 5 – *“Ghrelin receptor signaling targets segregated clusters of neurons within the nucleus of the solitary tract”*. Cornejo MP, De Francesco PN, García Romero G, Portiansky EL, Zigman JM, Perelló M. Brain Struct. Funct., 2018.
- 6 – *“Ghrelin Recruits Specific Subsets of Dopamine and GABA Neurons of Different Ventral Tegmental Area Sub-nuclei”*. Cornejo MP, Barrile F, De Francesco PN, Portiansky EL, Reynaldo M; Perello M. Neuroscience, 2018.